

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EFFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE EL LINFOMA MURINO L5178Y-R

POR

SONIA MONTERO MOLINA

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

ENERO, 2016

**EFFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE
EL LINFOMA MURINO L5178Y-R**

Comité de Tesis

Presidente. Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

Secretario Dra. Diana Caballero Hernández

Vocal Dra. Patricia Taméz Guerra

Vocal Dr. Moisés Franco Molina

Vocal Dr. Edgar Mendoza Gamboa

**EFEECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE
EL LINFOMA MURINO L5178Y-R**

Dirección de Tesis

Director. Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores

AGRADECIMIENTOS

Mi mayor agradecimiento para el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su importante apoyo durante mis estudios de Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Quiero agradecer también a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla, por toda su amabilidad y por haberme aceptado en el Laboratorio de Inmunología y Virología para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias. Así como también agradecer al resto de profesores y en especial a la Dra. Diana Caballero Hernández y al Dr. Ricardo Gómez Flores. Por último, agradecer al Dr. Armando Trejo del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (U.A.N.L.) por su colaboración en la realización del presente proyecto de Tesis de Maestría.

DEDICATORIA

Quisiera dedicar el presente proyecto de Tesis a todos los que me han apoyado y confiado en mí, no sólo en este tiempo de estudio de Maestría sino durante toda mi formación. En primer lugar y en especial a mis padres, Ignacia y Felipe, que me han apoyado y animado siempre en las decisiones que he tomado, aunque no hayan sido fáciles para ellos. Gracias por enseñarme desde muy pequeña todos los valores que me hacen ser quien soy hoy en día, y por estar conmigo a pesar de la distancia.

También quisiera dedicarle este trabajo a la Ing. Mónica Cruz, por su apoyo incansable, su coaching y sus tremendos ánimos durante todo este tiempo. Por hacerme ver siempre la parte positiva de la situación, la otra cara de la moneda, por más complicado que fuera.

También quisiera mencionar a mis compañeros y amigos de Maestría, porque sin ellos no habría sido lo mismo: Edgar, Víctor, Sara Paola, Juanjo, Tavo, Baldo, Daniela, Arely y Evelyn.

También quisiera agradecer a otros compañeros que siempre fueron amables y dispuestos a ayudar, a pesar de lo perdida que estaba al principio, como Daniela, Alonso, Erika, Carmen, Humberto, así como a Carolina Bonilla y Karina Chávez y sus respectivos laboratorios por prestarme amablemente los primers para PCR punto final. Y a compañeros de charlas y laboratorio como Jorge, los Armandos, Enrique, Rodrigo y Luis Jerónimo.

A mis abuelos, Francisco y Francisca, por todas las velas que han encendido durante esta etapa, deseándome lo mejor en cada paso.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
3. Justificación	20
4. Hipótesis	21
5. Objetivo del trabajo	22
6. Material y métodos	23
6.1 Materiales	23
6.1.1 Animales:	23
6.1.2 Linfoma murino L5178Y-R:	23
6.2 Métodos	25
6.2.1 Protocolo de inducción del estrés crónico	25
6.2.1.1 Estrés por restricción del movimiento	26
6.2.1.2 Estrés por nado forzado	27
6.2.2 Prueba de la preferencia por sacarosa	28
6.2.3 Monitoreo del peso corporal e índice de masa corporal	29
6.2.4 Determinación de progresión tumoral <i>in vivo</i>	29
6.2.5 Cuantificación de los niveles plasmáticos de corticosterona y norepinefrina	30
6.2.6 Cuantificación de citocinas Th1/Th2/Th17 plasmáticas e intratumorales	31
6.2.7 Determinación del nivel de expresión de <i>VEGF</i>, <i>HIF-1α</i>, <i>VEGF-R2</i> e <i>IL-6</i> por PCR punto final	32
6.2.7.1 Extracción de RNA y retrotranscripción a cDNA	32
6.2.7.2 PCR punto final	33
6.2.8 Extracción de proteínas tumorales	36
6.2.9 Análisis histológico del linfoma murino L5178Y-R en ratones estresados/no estresados	37

6.2.10 Análisis estadístico.....	38
7. Resultados.....	39
7.1. Evolución del peso corporal e índice de masa corporal.....	39
7.2 Peso y volumen tumoral.....	42
7.3 Prueba de preferencia por sacarosa	46
7.4 Niveles plasmáticos de las principales hormonas del estrés: corticosterona y norepinefrina.....	49
7.5 Cuantificación de citocinas Th1, Th2 y Th17 en plasma y tumor.....	53
7.5.1 Niveles plasmáticos de citocinas Th1, Th2 y Th1.....	53
7.5.2 Cuantificación de citocinas intratumorales por citometría de flujo.....	56
7.6 Expresión génica de los genes <i>VEGF</i> , <i>HIF-1α</i> , <i>VEGF-R2</i> e <i>IL-6</i> por PCR punto final.....	58
7.7 Análisis histológico del linfoma L51Y8Y-R bajo condiciones de estrés crónico y de reposo.....	62
7.7.1 Muestras de tumor en reposo.....	62
7.7.2 Muestras de tumor bajo estrés crónico.....	67
7.7.3 Clasificación semicuantitativa de características histológicas del tumor.....	70
8. Discusión.....	71
9. Conclusiones.....	76
10. Perspectivas.....	77
11. Bibliografía.....	78
Resumen biográfico.....	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Calendario empleado durante los 24 días de duración del protocolo, donde RE= estrés por inmovilización, FS= Nado Forzado y R= Descanso de Estrés y TM= Medición de tumor y peso.....	25
Tabla 2. Lista de los primers empleados para realizar los ensayos de PCR punto final.....	33
Tabla 3. Clasificación semicuantitativa de características histológicas presentes en el linfoma murino.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Inducción de estrés por restricción del movimiento en ratones BALB/c de 11 semanas de edad. b) Ratones hembras Balb/c durante la sesión de restricción de movimiento, en la parte final del protocolo.....	26
Figura 2. En las imágenes se muestran algunos de los ratones de experimentación mientras se realizaba la prueba de nado forzado, como parte del protocolo de inducción del estrés crónico.....	27
Figura 3. Evolución del peso corporal de los cuatro grupos experimentales durante los 24 días de duración del protocolo de estrés crónico.....	39
Figura 4. Representación de los valores de IMC de los 4 grupos experimentales al final del protocolo de inducción de estrés crónico. Puede observarse que se dio un menor índice de masa corporal en los grupos bajo estrés crónico ($p<0.05$) que en condiciones de reposo.....	41
Figura 5. Evolución del peso tumoral (mg) estimado bajo estrés crónico y reposo durante el protocolo de inducción de estrés crónico.....	42
Figura 6. Evolución del peso volumen tumoral en los grupos bajo estrés crónico y reposo a lo largo de los 24 días del experimento.....	43
Figura 7. Representación del peso tumoral final medio de los grupos portadores de linfoma.....	44
Figura 8. En las imágenes a, b y c se muestran tres de los tumores extraídos del grupo de ratones en reposo, mientras que en las imágenes d, e y f, se muestran tres de los tumores de ratones bajo estrés crónico.....	45
Figura 9. Se muestran los resultados obtenidos en la prueba de preferencia por sacarosa, de los días 7 (Figura 9A), 14 (Figura 9B) y 21 (Figura 9C), a las 24 y 48 horas.....	47
Figura 10. Niveles plasmáticos de corticosterona (ng/mL) determinados por ELISA, tras la realización del protocolo de inducción de estrés crónico, en los grupos controles y portadores de tumor (en condiciones de reposo y bajo estrés crónico).....	49

Figura 11. Cuantificación de los niveles plasmáticos de norepinefrina por ensayo de ELISA, en los grupos control (sin tumor) y portadores de tumor, bajo reposo y estrés crónico.....	51
Figura 12. Cuantificación de los niveles plasmáticos de citocinas a) IL-2, b) IL-4, c) IL-17, d) IFN-gamma, e) IL-6 en los distintos grupos experimentales.....	54
Figura 13. Cuantificación de citocinas Th1, Th2 y Th17 en extractos de proteínas de muestras tumorales de ratones Balb/c bajo estrés crónico y reposo.....	57
Figura 14. Se muestran las imágenes correspondientes a los geles de agarosa tras la electroforesis de las muestras de PCR punto final (para los genes <i>VEGF</i> , <i>HIF-1α</i> , <i>VEGF-R2</i> , <i>IL-6</i> y <i>β-Actina</i>) y tras el análisis de densitometría correspondiente con el software libre ImageJ.....	59
Figura 15. Representación del análisis final de los datos obtenidos por densitometría, donde se representan los diferentes ratios obtenidos para los genes <i>VEGF</i> , <i>HIF-1α</i> , <i>VEGF-R2</i> e <i>IL-6</i> , en comparación con el control estadístico (valor =1), observándose diferencia significativa en la expresión de <i>VEGF-R2</i> (p=0.0032).....	60
Figura 16. a) Infiltración tumoral entre las fibras musculares de la extremidad posterior derecha (10X) b) Anisocariosis y anisocitosis en las células del linfoma (40X). c) Se muestran focos hemorrágicos (40X). d) Se pueden observar importantes regiones de necrosis tisular (20X).....	63
Figura 17. a) Se muestran vasos sanguíneos sin infiltración de células tumorales (20X). b) Regiones de necrosis tisular, así como anisocitosis y anisocariosis (20X). c) Se observa que las células tumorales llegaron hasta el cartílago, y se muestran calcificaciones (40X). d) Proliferación del linfoma entre las fibras musculares (40X).....	65
Figura 18. a,b) Áreas de necrosis tisular (20X y 40X, respectivamente en a y b).....	66

Figura 19. a) Células tumorales del linfoma L5178Y-R así como algunos infiltrados del sistema inmune (40X). b) Presencia de pequeñas hemorragias. c) Regiones de necrosis tisular en linfoma murino bajo estrés crónico.....67

Figura 20. a) Células tumorales (linfoblastos) junto al tejido cartilaginoso. b) Focos hemorrágicos en el linfoma L5178Y-R. c) Se muestran las células tumorales con distintos tamaños de núcleos y citoplasmas.....68

Figura 21. a) Vasos sanguíneos entre las células tumorales, en animales bajo estrés crónico (40X). b) Amplias regiones de necrosis tisular, con infiltración muscular del tumor (10X).....69

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

HIF-1: Factor inducible por hipoxia 1

HPA: Hipotalámico-pituitario-adrenal

IMC: Índice de masa corporal

NE: Norepinefrina

SNC: Sistema nervioso central

SNS: Sistema nervioso periférico

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

VEGF-R2: Receptor 2 del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

RESUMEN

El estrés crónico se asocia con una mayor incidencia de diversas enfermedades de carácter crónico e infeccioso, además de afectar la iniciación y progresión del cáncer a través de diversos mecanismos, entre ellos, la angiogénesis. Se estudió el efecto de un paradigma de estrés crónico de 24 días de duración (con alternancia de restricción del movimiento y nado forzado) sobre el linfoma murino L5178Y-R, evaluándose la progresión del linfoma inoculado en ratones Balb/c y posibles variaciones en el peso corporal e índice de masa corporal (IMC). Una vez finalizado el protocolo, se cuantificaron los niveles plasmáticos de corticosterona y norepinefrina (hormonas indicadoras del estrés) y citocinas Th1, Th2 y Th17, así como se analizó la expresión génica de *VEGF*, *HIF-1 α* , *VEGF-R2* e *IL-6* bajo condiciones de estrés crónico y reposo. El protocolo de estrés crónico ocasionó una menor ganancia de peso (5-10 %) en ratones Balb/c hembras, así como una progresión más rápida del tumor ($p < 0.05$), no habiendo diferencias significativas en el peso tumoral final ($p > 0.05$) ni a nivel histológico. Se observaron variaciones en los niveles de norepinefrina (6-7 veces mayor) y corticosterona en presencia de tumor, pero no en los grupos control. Con respecto a los niveles plasmáticos de citocinas, hubo una mayor producción de IL-6 e IFN-gamma (en torno a veinte y diez veces más, respectivamente) en presencia de tumor, no habiendo diferencias significativas entre estrés y reposo ($p > 0.05$). Por PCR punto final se detectó la expresión de *HIF-1 α* , *VEGF*, *IL-6* y *VEGF-R2* en tumor, dándose una mayor expresión de *VEGF-R2* bajo estrés crónico, mientras que no hubo variaciones en la expresión del resto de los genes de interés implicados en el proceso de angiogénesis.

Por lo tanto, el protocolo de inducción de estrés crónico empleado genera ciertos cambios en la fisiología de los ratones (como el peso e IMC), pero no fue suficiente como para determinar cambios significativos en la expresión de los principales genes de angiogénesis, los cuales participan en la progresión tumoral.

ABSTRACT

Chronic stress is associated with chronic and infectious diseases, and participates in cancer initiation and cancer progression through different mechanisms such as angiogenesis. We studied the effect of a 24-day chronic stress protocol (restraint and forced swimming) on murine lymphoma L5178Y-R. We evaluated the lymphoma progression in female Balb/c mice and also possible variations in body weight and body mass index (BMI). Once the chronic stress protocol was finished, we quantified corticosterone and norepinephrine plasmatic levels, and Th1, Th2 and Th17 cytokines, as well as we analyzed gene expression of main angiogenesis factors which participate in tumor progression: *VEGF*, *HIF-1 α* , *VEGF-R2* and *IL-6* under chronic stress and control conditions.

Chronic stress caused loss of weight in female Balb/c mice, as well as faster tumor progression ($p < 0.05$) but no significantly differences were observed in final tumor weight/volume and histopathology. Changes in corticosterone and norepinephrine (a 6-7 fold change) plasmatic levels in tumor-bearing groups ($p < 0.05$) but not within control groups were detected. Regarding Th1, Th2 and Th17 cytokines plasmatic levels, there was a higher IL-6 and IFN-gamma (20 and 10 fold change, respectively) production in the presence of tumor but no significantly differences were observed between chronic stress and control conditions. Moreover, we detected *HIF-1 α* , *VEGF*, *IL-6* and *VEGF-R2* expression in tumor by end point PCR. There was an enhanced expression of *VEGF-R2* under chronic stress, while no differences were reported in the expression of the other analyzed genes ($p > 0.05$).

To conclude, the chronic stress protocol used in this research caused physiological changes in mice (like weight and BMI), but this was not enough to determine significantly changes in the expression of main angiogenesis genes.

1. INTRODUCCIÓN

El estrés crónico emocional se ha asociado con el desarrollo de desórdenes psicológicos, como la ansiedad y depresión, relacionándose también con un incremento en la incidencia de enfermedades de tipo infeccioso o crónico, así como con el inicio y la progresión del cáncer.

El estilo de vida de nuestra sociedad se ha vuelto más rápido y demandante en las últimas décadas, lo que provoca que el estrés esté presente en nuestra vida diaria, suponiendo un problema a nivel personal, social y económico. El estrés se define como un estado real o probable de amenaza de la homeostasis o equilibrio de los organismos, la cual va a ser retada constantemente por fuerzas adversas internas y externas, denominadas estresores (Chrousos y Stratakis 1995). El mantenimiento del equilibrio en presencia de diferentes estresores requiere de la activación de respuestas que implican al sistema inmune, nervioso y endocrino. La respuesta del estrés está mediada por el sistema del estrés, que engloba principalmente el Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Nervioso Simpático (SNS). El estrés crónico se ha definido como eventos múltiples de estrés que duran varias horas al día durante un periodo de varias semanas o meses, el cual altera la homeostasis de los organismos principalmente a través de la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), con la secreción de glucocorticoides, y de forma alternativa, activando al sistema adrenérgico con la producción de las catecolaminas, epinefrina y norepinefrina.

Por todos es sabido, que el cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, causando más de 8 millones de muertes al año y con miles de casos nuevos cada año. En el presente proyecto se estudió un modelo murino de linfoma. El linfoma causó algo más de 20,000 muertes en 2013 en Estados Unidos (Leukemia & Lymphoma Society), siendo el séptimo cáncer más común en ese país.

Se sabe que el estrés crónico emocional afecta a la progresión de diversos tipos de tumores, pudiendo incidir por medio de la supresión de la respuesta inmune antitumoral o regulando ciertos blancos moleculares relevantes para la progresión tumoral, como blancos indicadores de angiogénesis.

Una característica propia de muchos tipos de cáncer es la presencia de hipoxia en el tumor, ante la cual se activa el factor transcripcional HIF-1 α , cuyo principal gen diana es el Factor Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), teniendo como fin la formación de nuevos vasos sanguíneos para así poder aportar al tumor los nutrientes y el oxígeno necesarios para su sobrevivencia y desarrollo.

A su vez, en el microambiente tumoral, diversas citocinas pro-inflamatorias regulan el crecimiento del cáncer y contribuyen a promover la progresión tumoral, encontrándose entre ellas la IL-6, la cual se considera una citocina en respuesta al estrés. Una expresión incrementada de *IL-6* suele asociarse con un pronóstico desfavorable y existen antecedentes que indican una posible relación entre IL-6 y HIF-1 α /VEGF.

Por todo lo anteriormente mencionado, en el presente proyecto de tesis se estudió el efecto del estrés crónico sobre la progresión del modelo de linfoma murino por medio del proceso de angiogénesis. El protocolo tuvo una duración de 24 días y se tuvieron cuatro grupos experimentales, dependiendo de la presencia o no de tumor y la inducción o no de estrés crónico. Durante ese tiempo se evaluó la progresión del peso corporal y el volumen/peso del tumor. Una vez finalizado el protocolo, se tomaron muestras de tumor y sangre, cuantificándose la producción plasmática de las hormonas del estrés corticosterona y norepinefrina, así como diversas citocinas Th1, Th2 y Th17. Además de esto, se determinaron posibles variaciones en la expresión génica de los genes de interés: *VEGF*, *HIF-1 α* , *VEGF-R2* e *IL-6* como consecuencia de la inducción de estrés crónico.

Dada la importancia del estrés sobre los organismos y en la progresión del cáncer, el objetivo del presente estudio fue aportar información que nos permita contar con una mejor comprensión de los mecanismos efectores del estrés sobre la homeostasis de los seres vivos, especialmente aquellos con un papel potencial en la progresión del cáncer.

2. ANTECEDENTES

El estrés emocional o psicosocial se asocia con una alteración de la acción del sistema inmune y con el desarrollo de desórdenes psicológicos, incluyendo ansiedad y depresión (Thaker et al. 2007), además de relacionarse con un incremento en la incidencia de diversas enfermedades de carácter infeccioso, crónico o en cáncer. Por tanto, supone una problemática que afecta en los ámbitos personal, social y económico.

Todos los organismos deben mantener un equilibrio dinámico complejo, también denominado homeostasis. El estrés se define como un estado real o probable de amenaza de la homeostasis, la cual va a ser retada constantemente por fuerzas adversas internas y externas, denominadas estresores (Chrousos y Stratakis 1995). El mantenimiento de la homeostasis en presencia de diferentes estresores requiere de la activación de respuestas que implican al sistema inmune, nervioso y endocrino.

La respuesta del estrés está mediada por el sistema del estrés, que engloba principalmente el Sistema Nervioso Central y el Sistema Nervioso Simpático. El SN central incluye las hormonas hipotalámicas arginina vasopresina (AVP), hormona liberadora de corticotropina (CRH) y péptidos opiomelanocórticos derivados, el *locus ceruleus* y los centros de norepinefrina autonómicos en el tallo cerebral. Las dianas de estos efectores incluyen los sistemas cognitivo, efector, miedo, recompensa, crecimiento, ejes de hormonas tiroides y reproductivas, así como los sistemas inmune, metabólico, cardiorrespiratorio y gastrointestinal (Chrousos 2009).

El estrés crónico altera la homeostasis de los organismos principalmente a través de la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), con la secreción de glucocorticoides, y de forma alternativa, activando al sistema adrenérgico con la producción de las catecolaminas, epinefrina y norepinefrina.

En la respuesta al estrés, neuronas específicas del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH). A su vez, la CRH estimula la secreción de la hormona adrenocorticotropina o ACTH por parte de la pituitaria, la cual actúa sobre la corteza adrenal promoviendo la liberación de glucocorticoides. Existe una retroalimentación negativa, de manera que niveles

suficientes de glucocorticoides suprimen la producción de CRH y ACTH. Los glucocorticoides y catecolaminas influyen el tráfico y/o función de leucocitos y otras células inmunes, suprimiendo la secreción de citocinas proinflamatorias (TNF, IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12). Además, ambos sistemas de hormonas inducen un cambio de respuesta Th1 (inmunidad celular) a una respuesta Th2 (inmunidad humoral).

Los glucocorticoides (GC) son hormonas esteroideas secretadas por las glándulas adrenales durante la exposición a estresores agudos o crónicos para reducir la inflamación. El glucocorticoide activo en humanos es el cortisol, siendo producido y secretado por la corteza adrenal, mientras que en ratones tiene más importancia la corticosterona. La liberación de estas hormonas a la circulación tiene importantes efectos sistémicos, regulando procesos metabólicos e inmunes. Además, el eje HPA está ligado con el reloj circadiano, lo que resulta en la regulación de los niveles de glucocorticoides en un patrón diurno (Chung et al. 2011). Los efectos biológicos del cortisol están mediados en parte por la concentración mediada de los niveles circulantes de éste durante un cierto periodo de tiempo.

El receptor de glucocorticoides (GR) es un miembro de la familia de receptores nucleares y actúa como un factor de transcripción dependiente de ligando. Antes de la unión del cortisol, el GR es citoplasmático, donde se encuentra formando un complejo con Hsp90 y varias inmunofilinas (Lewis-Tuffin y Cidlowski 2006). La unión del ligando lleva a la disociación del complejo, la homodimerización del GR y la translocación al núcleo. Dentro del núcleo, el GR regula la expresión de genes diana, directamente a través de la interacción con elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) o indirectamente a través de la interacción con otros factores de transcripción. Existen diferentes isoformas del receptor de glucocorticoides.

El potencial de la actividad divergente de los receptores de GC en diferentes tipos de células es aún más evidente cuando se comparan los efectos de GC en cánceres derivados de células epiteliales frente a los derivados linfocíticos. En estos últimos, glucocorticoides sintéticos como la dexametasona (DEX) se usan rutinariamente para inducir muerte celular por apoptosis en células linfoides malignas (por ejemplo, en linfoma). En cambio, en tumores epiteliales (“sólidos”), según varios reportes se da el

efecto contrario, de manera que los GC estimulan la expresión de genes antiapoptóticos (Zhang et al. 2007).

Los glucocorticoides se administran rutinariamente antes, durante y después de la quimioterapia en tumores de células epiteliales para mitigar las náuseas y reacciones alérgicas. Los mecanismos mediados por GC que influyen la progresión de tumores sólidos no están limitados a efectos directos de estas hormonas sobre las células tumorales. La progresión tumoral implica interacciones simultáneas entre las células del cáncer, el microambiente que apoya la proliferación de las células y el ambiente del hospedador (Volden et al. 2013).

Los glucocorticoides sistémicos también pueden influenciar la progresión tumoral indirectamente a través de sus efectos en el sistema inmune y en el metabolismo. Como el papel de la respuesta al estrés en células tumorales derivadas linfoides es una modulación inmune y apoptosis inducida por GC, gran parte de la investigación sobre el comportamiento ligado al cáncer se ha focalizado en la función del sistema inmune (Armaiz-Pena et al. 2009).

Otro de los componentes del sistema del estrés es el sistema nervioso simpático, que lleva a cabo la liberación de catecolaminas, entre las que se encuentran epinefrina y norepinefrina. Las catecolaminas afectan a numerosos tipos de células incluyendo células epiteliales del cáncer y células estromales del microambiente del tumor. Estas hormonas se liberan como respuesta al estrés y parecen tener una sinergia en las acciones biológicas junto con los glucocorticoides, como por ejemplo, incrementando la movilización de las reservas energéticas (Moreno-Smith et al. 2010). Para llevar a cabo su función la epinefrina y norepinefrina se unen sus receptores, denominados receptores adrenérgicos, los cuales pueden clasificarse en α o β , estando a su vez divididos en subtipos: β (β_1 , β_2 , β_3), α_1 (α_{1a} , α_{1b} , and α_{1d}) y α_2 (α_{2a} , α_{2b} , and α_{2c}) (Leineweber et al. 2004).

Los receptores adrenérgicos pertenecen a la familia de receptores transmembrana acoplados a proteína G (GPCR). En general, los receptores α_1 son importantes en la vasoconstricción de vasos sanguíneos, así como en la adaptación del corazón a condiciones de estrés, mientras que los receptores α_2 regulan la liberación de

neurotransmisores (Hein et al. 1999). Los receptores β -adrenérgicos regulan principalmente la señalización en tejido cardíaco, pulmonar, reproductivo y metabólico, mediante la respuesta a estrés del sistema nervioso simpático (Cole y Sood 2012).

Existen amplias evidencias de que en humanos y modelos animales, la expresión de las hormonas catecolaminas relacionadas con estrés, pueden afectar a la progresión del tumor a través de la modulación de varios procesos, incluyendo la desregulación del sistema inmune, la reparación del DNA, etc. (Glaser et al. 1987). Diversos estudios muestran que la activación de los receptores β -adrenérgicos puede llevar a la estimulación en la progresión de varios tipos de cáncer como pancreático, de ovarios, mama, carcinoma nasofaríngeo y mieloma múltiple (Yang et al. 2013). Se observó que la activación de ambos tipos de receptores supone un incremento en la tasa de proliferación de las células de cáncer de mama *in vitro* así como un incremento en el tamaño tumoral en animales modelo (Obeida y Conen 2013).

Las catecolaminas pueden influenciar la expresión de factores como VEGF y metaloproteinasas de matriz (MMPs), afectando por tanto, la proliferación, angiogénesis y metástasis (Thaker et al. 2007). Además, la IL-6 e IL-8, también producidas en respuesta a catecolaminas, promueven la angiogénesis directamente estimulando la proliferación y diferenciación de las células endoteliales o bien induciendo la producción de factores adicionales pro-angiogénicos por las células del estroma tumoral (Payne y Cornelius 2002). Además, recientemente se ha observado que la norepinefrina induce la expresión de VEGF en varias líneas celulares de cáncer (próstata, mama, hígado, páncreas) de manera dependiente del factor inducible por hipoxia, HIF-1 α (Park et al. 2011; Shan et al. 2013).

Hipoxia y el factor inducible por hipoxia (HIF-1 α):

Una característica propia de muchos tipos de cáncer es la presencia de hipoxia en el tumor. El oxígeno es un componente indispensable de los procesos metabólicos eucarióticos. Cuando la demanda de oxígeno excede su aporte celular, las células y tejidos a menudo entran en un estado de hipoxia. La hipoxia es un factor importante en la patología de diferentes enfermedades, tales como la diabetes, isquemia y el cáncer (Melvin and Rocha 2012). La hipoxia puede promover la progresión tumoral e inducir resistencia a la quimioterapia. Uno de los principales mediadores de la respuesta hipóxica es el factor inducible por hipoxia (HIF), que activa genes de respuesta a hipoxia, los cuales están implicados en múltiples aspectos como tumorigénesis y progresión del cáncer, incluyendo proliferación, metabolismo, angiogénesis, invasión, metástasis y resistencia a terapia (Lou et al. 2014).

Los tumores sólidos sufren de hipoxia porque la vascular normal del tejido sólo puede aportar oxígeno a un tamaño tumoral de unos 2 mm de diámetro (Folkman 1971). La tensión de oxígeno en tejidos normales es de aproximadamente 7 %, mientras que en los tejidos tumorales es de 1.5 % (Vaupel et al. 2004). La respuesta celular a cambios en la tensión de oxígeno durante el desarrollo normal o bien en procesos biológicos está regulada en parte por el factor inducible por hipoxia (HIF).

Los HIFs son factores de transcripción de unión a DNA que median respuestas celulares ante condiciones de disponibilidad de oxígeno reducida, a través de la activación transcripcional de múltiples genes que codifican para proteínas necesarias para la entrega de oxígeno a los tejidos y para el metabolismo energético (Manalo et al. 2005; Elvidge et al. 2006). Son proteínas HTH-PERANT-SIM que forman heterodímeros, constante de una subunidad dependiente de oxígeno HIF- α y una subunidad estable, HIF- β . En conjunto, estas subunidades se unen a elementos responsables de hipoxia (HRE) y cuya secuencia consenso es G/ACGTG. Principalmente, el control de la actividad de HIF está relacionado con modificaciones post-traduccionales y estabilización de las proteínas HIF-1 α y HIF-2 α .

Bajo condiciones de normoxia o tensión normal de oxígeno, HIF-1 α es degradado rápidamente por el proteasoma y no es detectable. En ausencia de otras perturbaciones metabólicas, los residuos de prolina 402 y 56 del dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD) son hidroxilados por enzimas prolil-hidroxilasas (PHDs). Las PHD requieren oxígeno para llevar a cabo la hidroxilación, así como 2-oxoglutarato, hierro (Fe²⁺) y ascorbato, como cofactores. La hidroxilación de estos dos residuos media la unión a la proteína supresora de tumor Von Hippel-Lindau (pVHL), que es el componente de reconocimiento del complejo ubiquitina ligasa E3 y tiene como diana HIF-1 α para la ubiquitinación y degradación por el proteasoma 26S (Kaelin 2005).

Además de la vía pVHL, uno de los principales mecanismos por los que HIF-1 α permanece estable es por medio de SUMO-1 (small ubiquitin-like modifier-1) y RSUME (RWD-containing sumoylation enhancer). La expresión ectópica de SUMO-1 incrementa la estabilidad de HIF1 y se aumenta su actividad transcripcional. RSUME es inducido bajo condiciones de hipoxia y promueve la sumoilation de HIF-1 α llevando, a incrementar su actividad transcripcional y estabilidad (Carbia-Nagashima et al. 2007). Otra vía de degradación independiente de pVHL es por medio de la proteína quinasa C activada (RACK1) y la proteína de shock térmico 90 (Hsp90). RACK1 promueve la ubiquitinación y degradación de HIF-1 α a través del reclutamiento del complejo ubiquitina ligasa elongina C/B, mientras que Hsp90 regula positivamente la estabilidad de HIF-1 α a través de la competencia con RACK1 por la unión al dominio PAS (Liu et al. 2007).

Cuando los niveles de oxígeno son bajos, HIF α escapa a la hidroxilación mediada por PHD, por lo que no será reconocida ni ubiquitinizada, pudiendo traslocarse al núcleo, donde activa la transcripción de cientos de genes implicados en eritropoyesis, autofagia, metabolismo energético y angiogénesis (Kaelin y Ratcliffe 2008). La actividad de HIF también está influenciada por el factor inhibidor de HIF (FIH). Cuando el oxígeno está disponible, FIH hidroxila un residuo conservado de asparagina dentro del dominio de transactivación Ct de HIF α , por lo que se previene la unión a coactivadores tales como p300/CBP.

Otra enzima implicada en la regulación de HIF-1 α es la piruvato quinasa, la enzima final de la glucólisis. Presenta distintas variantes y en tumores, la variante M2 es la forma predominante, habiéndose reportado que HIF-1 α activa la transcripción de PKM2 (Christofk et al. 2008; Luo et al. 2011). Específicamente, la hidroxilación de PKM2 mediada por PHD3 incrementa la unión de HIF-1 α a los HRE de sus genes diana, por lo que actúa como coactivador. La expresión de los genes diana de HIF-1 α estimulada por PKM2 promueve un cambio de fosforilación oxidativa a metabolismo glicolítico, además de incrementarse la expresión del gen que codifica para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Luo et al. 2011).

HIF-1 α es un importante regulador de la angiogénesis y la regulación y estabilidad de este factor está mediada por factores de transcripción relacionados con *runt* (RUNX). Una sobreexpresión de RUNX1 inhibe la unión al DNA y la actividad de la proteína HIF-1 α , dándose como consecuencia una expresión reducida de VEGF, mientras que el silenciamiento de la expresión de RUNX1 por siRNA incrementa la actividad transcripcional de la proteína HIF-1 α . Esto sugiere que RUNX1 actúa como un inhibidor de la función de HIF-1 α (Peng et al. 2012). En cambio, una sobreexpresión del factor RUNX2 incrementa la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* a través de una secreción incrementada de VEGF (Brocato et al. 2014).

HIF-1 α también va a presentar regulación independiente de oxígeno, como por ejemplo, por medio del factor asociado a hipoxia (HAF), una E3-ubiquitina ligasa que se une a HIF-1 α y promueve su degradación proteasómica independientemente de la tensión celular de oxígeno (Koh et al. 2008). HAF es capaz de regular negativamente los niveles de HIF-1 α bajo condiciones en las cuales pVHL-E3 ligasa está inactivo, como en condiciones de hipoxia.

Los genes activados por HIF están implicados en tumorigénesis y progresión del cáncer, incluyendo proliferación, metabolismo, invasión, angiogénesis y metástasis. Se ha observado una expresión incrementada de HIF-1 α en un amplio rango de cánceres humanos, estando a menudo esta expresión correlacionada con un mal pronóstico de la enfermedad. Los niveles de HIF-1 α y VEGF están significativamente asociados con la etapa del tumor y metástasis en hígado en pacientes con cáncer colorectal.

Los pacientes con valores positivos en HIF-1 α y VEGF, tendían a tener un peor pronóstico y una supervivencia más corta (Cao et al. 2009). De igual manera, en carcinoma hepatocelular, se han asociado los niveles altos de HIF-1 α con una invasión vascular y con un pronóstico pobre de los pacientes (Zheng et al. 2013). También en pacientes con carcinoma de células escamosas esofágicas, una alta expresión de HIF-1 α está asociada con metástasis de nódulos linfáticos, infiltración serosa y la etapa del tumor (Chai et al. 2013). Además, la expresión de HIF-1 α se correlaciona con angiogénesis y pronóstico desfavorable en cáncer de próstata, cáncer cervical invasivo en etapa temprana, cáncer pancreático, de cuello y cabeza, melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, y cáncer de pecho y ovarios (Brocato et al. 2014).

En oposición a lo anterior, otros estudios muestran que una sobreexpresión de HIF-1 α supone un mejor pronóstico en pacientes con carcinoma de células escamosas de etapa temprana de la cavidad bucal (Fillies et al. 2005) y también en carcinoma de células renales (Lidgren et al. 2006). En relación a esto, se ha visto que la sobreexpresión de HIF-1 α en las regiones perinecroticas está asociada a la expresión de genes asociados a hipoxia como anhidrasa carbónica IX (CAIX) y el transportador de glucosa 1 (GLUT1), dándose un peor pronóstico. En cambio, en tumores donde HIF-1 α se expresa de forma difusa, este hecho se correlaciona con un mejor pronóstico.

A continuación se muestran algunos de los genes diana de HIF-1:

Efectos en la progresión del cáncer	Genes diana de HIF-1
Angiogénesis	VEG, NOS, ET1, SFD1, ANGPT2, PDGF, leptina
Metabolismo de glucosa	GLUT1, HK, LDHA, MCT4, PDK1, MXI1
Proliferación celular	NOS, IGF-2, TGF, c-MYC, ID2
Apoptosis celular	P53, BNIP3, Caspasa 3
Invasión y metástasis	MMP2, FN1, c-MET, AMF, KRT14

VEGF es el principal gen diana de HIF-1 que participa directamente en la angiogénesis. Sin embargo, HIF-1 contribuye a la angiogénesis por medio de mecanismos más complejos, a través de la producción de la óxido nítrico sintasa (NOS), endotelian-1 (ET-1), SDF-1 (factor 1 derivado de células estromales), angiopoyetina 2 (ANGPT2), leptina, etc. Por tanto, HIF-1 es un factor transcripcional clave en procesos de angiogénesis, proliferación celular y metástasis, entre otros.

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF):

La angiogénesis ocurre en condiciones fisiológicas durante el desarrollo embrionario, la curación de las heridas y la regeneración de tejidos (Carmeliet 2000) y se define como el proceso de desarrollo de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura preexistente. En estas condiciones, la angiogénesis es un proceso altamente regulado y organizado. En cambio, en condiciones patológicas, como en el cáncer o en la inflamación crónica, la angiogénesis lleva a la formación de redes vasculares desorganizada, caótica y funcionalmente pobre (McDonald y Choyke 2003).

La angiogénesis está sujeta a un sistema complejo de control, con factores proangiogénicos y antiangiogénicos. Uno de los factores proangiogénicos más importantes es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). La familia VEGF está compuesta por 7 miembros: VEGF-A a VEGF-F y PlGF. VEGF-A está presente en pulmón, riñón, corazón y glándulas adrenales, mientras que VEGF-C se encuentra en corazón, placenta, ovarios, intestino delgado y glándula tiroidea.

Existen tres receptores tirosin quinasas VEGF: VEGFR-1,2 y 3, siendo VEGFR2 el más importante en la inducción de mitogénesis y permeabilidad mediada por VEGF. Además, VEGFR-3 sólo se une a VEGF-C y D, estando generalmente restringido a células endoteliales linfáticas, migración, diferenciación y supervivencia de estas células (Achen et al. 1998; Partanen et al. 2000).

VEGF-A tiene un papel central en la angiogénesis y neovascularización, incrementando la entrega de oxígeno y sustratos energéticos. La expresión celular de VEGF-A está sujeta a hipoxia o hipoglucemia. El complejo de la proteína inducible de hipoxia, HIF-1 se une a los enhancers del gen *VEGF-A*, *EPO* y otros genes críticos, tales como genes implicados en enzimas glicolíticas y transportadores de glucosa. STAT3 es capaz de activar la expresión de VEGF (Niu et al.2002). Se demostró que la interacción de la señalización de STAT3 inhibe la expresión de VEGF-A.

En el tumor, el estroma está compuesto por nuevos vasos sanguíneos, células inflamatorias, tejido conectivo y matriz de fibrina-gel. Hay pocas diferencias entre la formación del estroma tumoral y el proceso de sanado de las heridas. En primer lugar, la curación de las heridas es precedida por daño de tejidos y segundo, las plaquetas no se encuentran fuera de los vasos sanguíneos en tumores sólidos. Además, la fibrina y fibronectina permanece en el tumor estromal, mientras que tienen una presencia transitoria en las heridas (Hoeben et al. 2004).

Los vasos sanguíneos del núcleo y de la periferia del tumor en desarrollo van a diferir. Los vasos centrales presentan características como uniones interendoteliales abiertas, endotelio fenestrado y una membrana basal discontinua o ausente. En contraste, los vasos periféricos son mayores y venulares, estando formados por células endoteliales caracterizadas por fenestraciones y atenuación.

Durante la tumorigénesis, las lesiones neoplásicas se encuentran inicialmente en una fase de crecimiento avascular, hasta alcanzar un tamaño no mayor de 2-3 mm³. Esta fase es seguida por un segundo evento, el cual permite distinguir un tumor en crecimiento de otro que está en dormancia. Esto es lo que se denomina el “switch” angiogénico, de forma que se inicia una cascada de eventos que llevan a la expansión del volumen del tumor y posteriormente, puede llegar a generarse metástasis (Hoeben et al. 2004).

Un importante inhibidor de la angiogénesis es el gen supresor de tumores p53, el cual arresta la progresión del ciclo celular bajo condiciones no viables y media la apoptosis inducida por hipoxia. P53 inhibe la expresión de VEGF-A pero no de VEGF-B o VEGF-C (Ravi et al. 2000).

Las condiciones hipóxicas llevan a una sobre-regulación tanto de p53, como de HIF-1 α (Carmeliet et al. 1998). Siempre que no esté mutado p53, HIF-1 α se une a éste, lo estabilizada y esta asociación inicia la apoptosis. En cambio, la pérdida de expresión de p53 incrementa la heterodimerización de HIF-1 α y HIF-1 β , lo cual incrementa la expresión de VEGF-A en células tumorales.

Uno de los mecanismos que permiten la evasión del control del sistema inmune sobre los tumores, es la generación de respuestas inmunes antitumorales defectivas. Las células dendríticas (DC) juegan un papel central en la inmunidad antitumoral. Se ha descrito una disminución del número de células dendríticas en pacientes en etapas tempranas de cáncer (Almand et al. 2000). La producción de factores solubles derivados del tumor es crítica para la generación de estas células inmaduras y VEGF es uno de los principales factores implicados en estos defectos (Hoeben et al. 2004). La unión de VEGF-A a células progenitoras de células dendríticas por medio de VEGFR-1, lleva a una inhibición de NF- κ B, el cual regula la transcripción de muchos genes implicados en la respuesta inmune (citocinas y factores de crecimiento). Esta inhibición lleva a una maduración defectiva de las células dendríticas, pudiendo contribuir a una inducción subóptima de la inmunidad en pacientes con cáncer (Gabrilovich et al. 1999).

La producción de VEGF está regulada por diferentes hormonas y citocinas. VEGF puede ser inducido por norepinefrina, una de las principales hormonas del sistema nervioso simpático producida durante estrés agudo y crónico. La norepinefrina incrementa la expresión de VEGF en el tejido adiposo marrón (Tonello et al. 1999), además de en otros tejidos. También los glucocorticoides influyen al VEGF, de forma que la dexametasona, un glucocorticoide sintético, disminuye la expresión de VEGF en células de glioma, aunque su efecto disminuye drásticamente en condiciones hipóxicas, como ocurre en el crecimiento tumoral (Machein et al. 1999).

IL-6:

La contribución de la inflamación crónica al desarrollo tumoral ha sido ampliamente atribuida a su posibilidad de inducir mutaciones (por ejemplo a través de reactivos de oxígeno o especies de nitrógeno). Sin embargo, datos recientes proponen un efecto directo de la inflamación en el crecimiento del tumor. Se ha visto que varias citocinas pro-inflamatorias secretadas por células de la inmunidad innata y adaptativa regulan el crecimiento del cáncer y contribuyen a promover la progresión del tumor. Entre ellas se encuentra la IL-6, que parece tener un papel importante en el desarrollo del cáncer en humanos, de forma que una expresión incrementada de IL-6 se ha asociado con un pronóstico desfavorable en pacientes con varios tipos de cáncer (Lederle et al. 2011; Guo et al. 2012).

La IL-6 se describió inicialmente como un factor de diferenciación de células B en 1986 y se le ha atribuido un papel versátil en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa. De hecho, está implicada en la inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda en hepatocitos, la diferenciación de monocitos a macrófagos, la proliferación y resistencia frente a apoptosis en células T y la producción de citocinas de tipo Th2 (Diehl y Rincon 2002; Neurath y Finotto 2011). Datos recientes sugieren un papel crítico de la IL-6 durante la inflamación crónica, ya que es requerida para la inducción de células Th17, además de inhibir la diferenciación de linfocitos T reguladores.

La IL-6 es producida por varios tipos de células, incluyendo a monocitos, macrófagos, queratinocitos, fibroblastos, células B y T, células endoteliales y varios tipos de células tumorales (Kishimoto 1989). Sin embargo, los monocitos y macrófagos son sus principales productores durante la inflamación aguda y las células T durante la inflamación crónica. En estas células, la expresión de IL-6 es regulada a través de varios factores de transcripción tales como NF- κ B, C/EBP β o AP-1.

La IL-6 se une a la subunidad del receptor de membrana de IL-6 (mIL-6R, CD126) en las células blanco. A continuación, este complejo se asocia con un homodímero de la segunda subunidad del receptor, la glicoproteína 130 (gp130, CD130) y permite desencadenar la cascada de activación correspondiente. Esta es la llamada señalización clásica, restringida a células que expresan tanto la subunidad mIL-6R como

la gp130. La expresión de mIL-6R está limitada a hepatocitos y algunos leucocitos, mientras que la gp130 está ampliamente expresada (Yamamoto y Rose-John 2012). Además, una forma soluble del receptor de IL-6 (sIL-6R) permite la señalización de la IL-6 en células que no expresan mIL-6R, y esto se denomina “trans-señalización”. Esta forma soluble se produce tanto por proteólisis de mIL-6R a través de la metaloproteínasa ADAM17, como por un splicing alternativo del mRNA de la IL-6.

Ambos tipos de receptores van a activar las mismas vías de señalización, lo que incluye la activación de quinasas Janus (JAKs), así como la activación del factor de transcripción STAT3. Una señalización persistente de JAK-STAT3 está implicada en muchos aspectos de tumorigénesis. Bajo condiciones fisiológicas, la vía JAK-STAT está estrechamente regulada. Sin embargo, en la mayoría de los cánceres, las proteínas STAT y particularmente STAT3, están activadas de forma aberrante (Yu and Jove, 2004). Por ejemplo, mutaciones somáticas de ganancia de función dentro del dominio extracelular D2 del receptor gp130, resultan en una hiperactivación del receptor, con la consecuente fosforilación de STAT3 y desarrollo del adenoma hepatocelular inflamatorio (Zhang y Lai 2014). Por otro lado, se observa el silenciamiento epigenético de SOCS3 en muchos cánceres epiteliales.

Algunos reguladores positivos de esta vía son: IL-21, IL-10, IL-22, IL-27, TNF- α , G-CSF, leptina, receptor de tirosina quinasas MET y EGFR, etc. (Yu y Jove 2004). Mientras que algunos reguladores negativos son las proteínas tirosin fosfatasas LMW-DSP2, TC-PTP, PTPRD, SHP1 and SHP2 (Kim et al. 2010). STAT3 activa la transcripción de genes diana que están implicados en: la supervivencia de las células tumorales (p.e. Bcl-2, Survivin, Mcl-1), angiogénesis (p.e. HIF-1 α , VEGF), proliferación (p.e., c-Myc, ciclina D1, ciclina B, cdc2, c-jun- c-fos), metástasis (p.e. MMP2, MMP9), adhesión celular (p.e. ICAM-1, TWIST1), inflamación (p.e. IL-6, IL-17, IL-23, Cox2) y otros ((Jarnicki et al. 2010; Yu y Jove 2004).

STAT3 va a mediar efectos intrínsecos y también extrínsecos, como la angiogénesis, por medio de la regulación transcripcional de VEGF y HIF-1 α (Kujawski et al. 2008), así como la neovascularización, infiltración de células inmunes, activación de células mesenquimales y finalmente, progresión hacia la metástasis.

Sin la formación de nuevos vasos sanguíneos, el tumor no puede crecer más de 2-3 mm de diámetro. STAT3 interactúa con varios factores que afectan la angiogénesis, el cual es un paso crítico en carcinogénesis que incluye degradación de la membrana basal vascular, proliferación celular del epitelio vascular y migración, así como la reformación de nuevos vasos (Xiong et al. 2014).

La inhibición de STAT3 causa una disminución de la angiogénesis, principalmente por medio de una menor expresión de la metaloproteinasa 2 (MMP-2), que juega un papel importante en la degradación de la membrana basal vascular, bFGF2 y VEGFA. Por el contrario, una activación de STAT3 lleva a una elevada expresión de MMP-2 y VEGF-A. Por tanto, la inhibición de neo-angiogénesis por medio de la supresión de STAT3 se considera una posible estrategia para prever la formación de nuevos vasos sanguíneos (Kang et al. 2010).

La IL-6 tiene un papel importante en enlazar los sistemas inmune y nervioso, pudiendo actuar en respuesta a perturbaciones del sistema nervioso, como las que se dan en condiciones de estrés (Rohleder et al. 2012). Hay evidencias de que tanto el estrés agudo (Jankord et al. 2007) como el estrés crónico (Girotti et al. 2011) pueden incrementar el nivel de mRNA de IL-6 en el hipotálamo de ratones. A su vez, también se ha encontrado un incremento en los niveles periféricos de IL-6 en humanos y roedores expuestos a estrés agudo (Zhou et al. 1993; Steptoe et al. 2007). Además, es posible activar la expresión de IL-6 y STAT3 con paradigmas de estrés como la descarga eléctrica y el estrés crónico impredecible en ratones (Girotti et al. 2012), mientras que ratones knock-out para IL-6 muestran una resistencia al desarrollo de conductas depresivas producto del estrés (Chourbaji et al. 2006).

Recientemente, se demostró que la norepinefrina puede inducir la expresión a nivel de mRNA y proteína de la IL-6 en células epiteliales gástricas (GES-1, línea inmortalizada humana de células epiteliales gástricas) en condiciones de estrés. Esta inducción se da a través de receptores β -adrenérgicos (Yang et al., 2014). Esto mismo se vio en líneas humanas celulares de melanoma, donde observaron que la norepinefrina incrementa la expresión de VEGF, IL-8 e IL-6 (Yang et al. 2009).

Actualmente, se considera que la IL-6 está implicada en la promoción del tumor en varios tipos de cáncer humano como glioma, linfoma, melanoma, así como cáncer de mama, ovario, pancreático, próstata, renal y cáncer colorrectal. En cáncer colorrectal, se ha visto que la expresión de IL-6 puede estar asociada a la etapa del tumor, tamaño, metástasis y supervivencia de los pacientes (Knapfer y Preiss 2010). La IL-6 es un regulador central de una red de citocinas y factores de crecimiento autocrinos y paracrinos, tales como IL-8, CCL5, CCL2, CCL3, IL1- β , GM-CSF, VEGF and MCP-1, los cuales son sobreexpresados en el microambiente del tumor, promoviendo el crecimiento tumoral y metástasis (Lederle et al. 2011). Además, IL-6 y STAT3 son requeridos para la diferenciación de células Th17, la cual sostiene la inflamación por medio de la secreción de IL-17 e IL-23 y son responsables de la secreción de factores angiogénicos y TGF- β en fibroblastos y células endoteliales (Wang et al. 2009).

Uno de los mecanismos que incrementan los niveles de IL-6 puede ser la infiltración de tumores con células inflamatorias secretoras de IL-6 como se ha observado en cáncer asociado a colitis (CAC) (Waldner et al. 2010). Además de esto, se observó que la IL-6 induce la expresión del receptor de VEGF, VEGFR2, en células epiteliales intestinales y permite generar un bucle auto/paracrino, que promueve la proliferación de células tumorales de CAC a través de una activación de VEGFR2 dependiente de STAT3 (Waldner et al. 2010). En otros estudios, se vio que la expresión de STAT3 fosforilado (pSTAT3) se asocia con un incremento en la expresión de VEGF-A en cáncer pancreático humano, así como que la inhibición de STAT3 lleva a una reducción considerable en el crecimiento tumoral y la vascularización (Wei et al. 2003).

En cáncer pancreático, se mostró que la estimulación con IL-6 incrementa el contenido nuclear de HIF-1 α , así como que a su vez, la hipoxia genera un incremento de

la expresión del mRNA de IL-6, lo que sugiere la existencia de un bucle autocrino de activación IL-6/STAT3/HIF-1 α (Lang et al. 2007). También se encontró una sobreexpresión del eje IL-6/STAT-3/HIF-1 α en cáncer de células claras de ovario (OCCA) (Anglesio et al. 2011). En otras enfermedades, como en la psoriasis, se observó una sobreexpresión conjunta de HIF-1 α e IL-6, mostrándose una alta correlación entre ambos, sugiriendo una relación cercana de ambas en esta enfermedad (Vasilopoulos et al. 2013).

IFN-gamma:

Otra de las principales citocinas en la respuesta del sistema inmune frente al tumor es el IFN- γ , siendo una citocina pleiotrópica producida principalmente por linfocitos T y NK, pudiendo también ser producido por macrófagos. Es un mediador de los efectos anti-angiogénicos inducidos por IL-12. Los mecanismos anti-angiogénicos de los interferones de tipo I se debe a la inhibición del crecimiento de células epiteliales en humanos y ratones, así como la supresión de la expresión génica de FGF y metaloproteinasas de matriz (MMPs). Se sabe que el IFN- γ modela las etapas tempranas del crecimiento tumoral inhibiendo la angiogénesis del tumor (Beatty y Paterson 2001). IFN- γ actúa como una citocina anti-angiogénica inhibiendo la expresión del agente angiogénico VEGF-A y al mismo tiempo, incrementa el receptor VEGF-R1, que actúa como una molécula anti-angiogénica, atrapando al VEGF-A soluble (Komminenia et al. 2008).

El estrés crónico psicológico induce un decremento en los linfocitos circulantes y monocitos durante una reacción de hipersensibilidad por contacto. Encontraron una producción local reducida de IFN-gamma en animales estresados crónicamente y se cree que puede deberse a una desregulación del tráfico celular (Hall et al. 2014). Además, se observó que la exposición *in vitro* de células inmunes a glucocorticoides suprime la producción de IL-12 e IFN- γ , por medio de la activación de los receptores de glucocorticoides (Vieira et al. 1998). La reducción en la producción de IL-12 es un probable evento clave en la mediación de la supresión de la producción de IFN- γ inducida por estrés (Curtin et al. 2009). Se cree que el efecto supresor del estrés sobre la producción de IFN- γ ocurre de forma secundaria por medio de una reducción de la

producción de IL-12 mediada por glucocorticoides. En resultados previos en el laboratorio, se observó que en ratones portadores de tumor sometidos a estrés crónico, la producción de IFN- γ se reducía significativamente con respecto al grupo de ratones no estresados portadores de tumor (Nájera-Valderrábano et al. 2014), por lo que consideramos importante continuar estudiando el efecto del estrés sobre el IFN- γ , así como su relación con la angiogénesis por medio del VEGF.

3. JUSTIFICACIÓN

El estrés, aunque no se tienen cifras objetivas de su impacto en la población mundial, es considerado ya por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la epidemia del futuro, particularmente el estrés laboral. En México, de acuerdo a datos del Instituto Mexicano del Seguro Social, el 43% de los adultos sufre de estrés, y de acuerdo al Instituto Nacional de Psiquiatría, este país se encuentra entre los primeros lugares a nivel mundial con pacientes que sufren de estrés laboral.

Aunque hoy en día se reconocen los efectos detrimentales del estrés, físico y psicológico, para la salud y el bienestar a nivel individual, así como su impacto en los sistemas de salud y la productividad a nivel social, es aún mucho lo que se desconoce, principalmente como son afectados todos y cada uno de los sistemas que conforman a los sistemas vivos y como impactan estas perturbaciones en su correcto funcionamiento, así como cuáles son sus indicadores moleculares y blancos terapéuticos.

Con base en la literatura científica disponible podemos decir que el impacto del estrés sobre la salud es amplio; inflamación, cáncer, anemia, depresión. Entre estos, el cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, tan sólo en el año 2012 causó 8.2 millones de muertes, registrándose más del 60 % de estas defunciones se registran en países de ingresos bajos y medianos (Globocan, 2012).

Si bien numerosos estudios experimentales y epidemiológicos han establecido la relación causal entre el estrés y la progresión del cáncer, el propósito de este estudio es profundizar en estos efectos a nivel molecular, específicamente estudiar el efecto de un paradigma de estrés crónico sobre *VEGF*, *HIF-1 α* , *VEGF-R2* e *IL-6*, los cuales son relevantes en el proceso de angiogénesis y por tanto, en la progresión del cáncer, esto en un modelo murino de linfoma.

4. HIPÓTESIS

El estrés crónico altera la expresión de *HIF-1*, *VEGF*, *VEGF-R2* e *IL-6* en un modelo murino de linfoma.

5. OBJETIVO DEL TRABAJO

Objetivo general:

Determinar el efecto de un paradigma de estrés crónico sobre la expresión de *HIF-1*, *VEGF*, *VEGF-R2* e *IL-6* y citocinas TH1, TH2 y TH17 en un modelo murino de linfoma.

Objetivos particulares:

1. Inducir estrés crónico a animales portadores del linfoma murino L5178Y y animales controles sanos.
2. Determinar la progresión tumoral de animales estresados frente a no estresados.
3. Evaluar cambios en la conducta de los ratones (estresados/no estresados).
4. Determinar la producción de corticosterona, norepinefrina y citocinas TH1, TH2 y TH17 en plasma.
5. Cuantificar la expresión de los genes *HIF-1*, *VEGF*, *VEGFR-2* e *IL-6* en el linfoma L5178Y-R por PCR punto final.
6. Analizar cortes histológicos del linfoma murino L5178Y-R bajo condiciones de estrés crónico y de reposo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES:

6.1.1 Animales:

Se emplearon 24 ratones hembra Balb/c de aproximadamente 11 semanas de edad, proporcionados por el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas (U.A.N.L.) los cuales fueron mantenidos en jaulas microventiladas con acceso a agua y alimento *ad libitum* con un ciclo luz/oscuridad de 12 h (6AM-6PM), una temperatura ambiental controlada de 22°C y humedad relativa de 45°C. Los animales tuvieron un periodo de adaptación de 2-3 semanas tras su llegada.

Para llevar a cabo el experimento se determinaron cuatro grupos experimentales en función de la presencia o no de tumor, y la aplicación o no del estrés crónico:

1. *Ratones control sin tumor*

1.1 Condiciones normales de alojamiento (n=3)

1.2 Condiciones de estrés crónico (n=3)

2. *Ratones portadores del linfoma murino L5178Y-R*

2.1 Condiciones normales de alojamiento (n=9)

2.2 Condiciones de estrés crónico (n=9)

Todos los procedimientos de trabajo con los animales fueron aprobados por el Comité Interno de Ética del Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

6.1.2 Linfoma murino L5178Y-R:

En el presente proyecto de Tesis se empleó el modelo murino del linfoma L5178Y-R, el cual es un linfoma murino originalmente obtenidos en ratones de la cepa DBA/2 y que ha sido utilizado ampliamente en ratones Balb/c puesto que poseen el mismo haplotipo (H-2d) que la cepa DBA/2.

Las células L5178Y originales se obtuvieron a partir de un linfoma inducido por metilcolantreno en ratones DBA/2 el 8 de julio de 1951 en la Universidad de Yale (USA) (Szumiel et al. 2005). En cuanto al tipo celular, presentan una morfología de linfoblastos (origen tímico) y presenta la característica de ser resistente a rayos X y sensible a radiación ultravioleta (UV-C).

Este linfoma se mantiene por trasplante de ratón a ratón mediante la inyección intraperitoneal de un volumen de 0.2 mL de una suspensión celular (5×10^6 células/ratón) en ratones hembras Balb/c de 4 a 6 semanas de edad. Trece días después de la inoculación, se colectó el líquido ascítico de la cavidad peritoneal de los ratones (previamente sacrificados por dislocación cervical).

Después de esto, la suspensión ascítica se colectó en tubos de 50 mL con 10 mL de PBS. La suspensión celular se lavó dos veces en PBS, por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min, y se ajustó a una densidad de 2×10^7 células/mL (utilizando la cámara de Neubauer) en medio RPMI completo. Se inoculó 0.1 mL de la suspensión ajustada en forma subcutánea en la extremidad posterior derecha de ratones BALB/c de 11 semanas (Gómez-Flores et al. 2005). En los ratones control en los que no se inoculó la suspensión de células tumorales, se inoculó 0.1 mL de PBS en la extremidad posterior derecha.

6.2 MÉTODOS:

6.2.1 Protocolo de inducción del estrés crónico

Existen distintos paradigmas que han sido utilizados con la finalidad de generar un estrés crónico en los animales de experimentación. En el protocolo empleado para este proyecto de tesis se combinaron e intercalaron dos paradigmas diferentes con el objetivo de evitar la habituación de los animales al estrés: restricción del movimiento y nado forzado. Estos dos paradigmas se distribuyeron de forma aleatoria por un período de 24 días (Zamora-González et al. 2013) y se realizó siempre en un horario de mañana (9-10:30 a.m. aproximadamente).

A continuación, se muestra el calendario empleado para realizar el protocolo de inducción del estrés crónico (Tabla 1).

Días	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
	8 enero	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Estrés	RE	RE	RE	RE	RE	FS	RE	RE	FS	RE	R	RE	FS	RE	FS	RE	RE	R	RE	FS	RE	RE	FS	RE
TM/ Peso	X	X						X					X			X					X			X
Sucrosa	X							X							X							X		
Toma de muestras																								X

Tabla 1. Calendario empleado durante los 24 días de duración del protocolo, donde RE= estrés por inmovilización, FS= Nado Forzado y R= Descanso de Estrés y TM= Medición de tumor y peso.

6.2.1.1 Estrés por restricción del movimiento

Los ratones se colocaron de forma individual en un tubo cónico de 50 mL bien ventilado, sin posibilidad de moverse hacia adelante o hacia atrás en el dispositivo, y saliendo la cola al exterior por medio de un orificio en la tapa. Los animales fueron expuestos a estrés por restricción del movimiento durante 30 minutos diarios (Zamora et al. 2013). Durante este tiempo, los animales control permanecieron en sus jaulas sin que se perturbara su ambiente.

A continuación, se muestran algunas imágenes tomadas mientras se indujo el estrés en los ratones por restricción del movimiento (Figura 1).

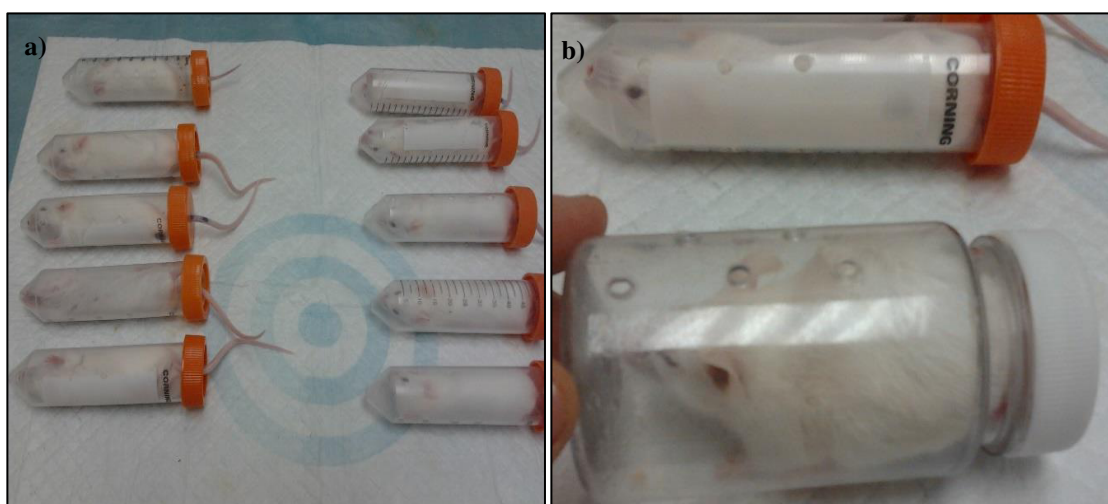


Figura 1. a) Inducción de estrés por restricción del movimiento en ratones BALB/c de 11 semanas de edad. b) Ratones hembras Balb/c durante la sesión de restricción de movimiento, en la parte final del protocolo.

En la última semana del protocolo, como consecuencia del incremento del tamaño del tumor se hizo difícil introducción de los ratones en los dispositivos utilizados, por lo que con la intención de no lastimar a los animales, se decidió emplear tubos de mayor grosor tal y como se muestra en la Figura 1b.

6.2.1.2 Estrés por nado forzado

Como se indicó anteriormente, la inclusión de este paradigma tiene como finalidad evitar la habituación al estrés de los animales de experimentación, por lo que se incluyó de forma aleatoria a lo largo del protocolo de 24 días de duración. Para llevar a cabo el nado forzado se emplearon recipientes cilíndricos de plástico de 13 centímetros de altura y 24 centímetros de diámetro, que contenían agua templada. Aquellos días en los que se aplicó el nado forzado, los animales permanecieron en estos recipientes durante 15 minutos. Durante todo ese tiempo se vigiló a los animales y se determinó el grado de movilidad de los ratones, es decir, si nadaban o se mantenían flotando (con el objetivo de detectar posibles cambios en el estado anímico ya que si únicamente flota se considera que ha perdido la “esperanza” y por lo tanto, está deprimido). En la Figura 2, se muestran imágenes de los ratones durante el nado forzado.



Figura 2. En las imágenes se muestran algunos de los ratones de experimentación mientras se realizaba la prueba de nado forzado, como parte del protocolo de inducción del estrés crónico.

6.2.2 Prueba de la preferencia por sacarosa o prueba de la anhedonia

Durante el periodo del protocolo de inducción del estrés crónico se llevó a cabo la prueba de preferencia por sacarosa, también denominada prueba de la hedonia, el gusto por el placer, la cual tiene como objetivo determinar posibles cambios en el estado anímico de los animales como consecuencia del estrés crónico inducido. El objetivo de la prueba es determinar la preferencia o no de los animales bajo estrés por una sustancia dulce, siendo ésta considerada como algo placentero o agradable, ya que los animales que se encuentran deprimidos o en estado de anhedonia, pierden el gusto por el placer.

La prueba consiste en darle a elegir a cada grupo experimental de ratones entre dos biberones, uno con 200 mL de agua del grifo y otro con 200 mL de una solución de sacarosa al 2%. La solución de sacarosa se preparó mediante la disolución de 4 g de sacarosa (Jalmek, CAS 57-50-1, Lote: 11-2004-18S59) en 200 mL de agua destilada.

Posteriormente, se determinó el nivel de ingesta de uno de los líquidos a las 24 y 48 horas, mediante la medición con probeta del volumen restante en los biberones. Con estos datos, se calculó el porcentaje de preferencia por sacarosa como el consumo de solución de sacarosa dividida por el consumo total de fluidos (agua más sacarosa), multiplicado por 100 (Chiba et al. 2012).

Antes de comenzar con el protocolo de estrés crónico, se realizó una adaptación de los animales a la sacarosa. Para ello, se ofreció por primera vez a los ratones una solución de sacarosa al 2 % así como agua normal y los recipientes se cambiaron de posición en la jaula cada 24 horas. Este periodo de adaptación tuvo una duración de tres días (Strekalova et al. 2004). Es importante que haya una adaptación inicial a la sacarosa, para evitar confundir una baja preferencia por sacarosa debida a un estado de anhedonia, con baja preferencia porque los animales no están acostumbrados a su presencia y pueden presentar cierto rechazo a lo nuevo. Posteriormente, se realizó la prueba de preferencia por sacarosa en los días 7, 14 y 21 del protocolo de inducción de estrés crónico.

6.2.3 Monitoreo del peso corporal e índice de masa corporal

Para determinar la evolución del peso corporal, los ratones fueron pesados en distintos días durante el protocolo: días 0, 7, 12, 15, 20 y 23. Para ello, se introdujeron individualmente en una caja de plástico envuelta con papel de aluminio, pesándose siempre tras la realización del protocolo de estrés crónico.

Además, se realizó el cálculo del índice de masa corporal (IMC) de los distintos grupos experimentales. Esto se llevó a cabo al final del protocolo y para ello, se midió la distancia ano-nasal y el peso corporal final, calculándose el IMC siguiendo la siguiente fórmula: $\text{Peso}/\text{Altura}^2$ (unidades g/cm^2).

6.2.4 Determinación de progresión tumoral *in vivo*

Para determinar los cambios en la progresión tumoral se determinaron los siguientes parámetros en los días 0, 7, 12, 15, 20 y 23 del protocolo.

- a) **Peso tumoral:** el peso tumoral se estimó por la medición calibrada del largo (A) y del ancho (B) del tumor, empleándose para el cálculo la siguiente fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{A \text{ (mm)} \times B^2 \text{ (mm)}}{2}$$

- b) **Volumen tumoral:** el volumen tumoral se calculó partir los diámetros perpendiculares del tumor (Tomayko y Renolds 1989; Feldmand et al. 2009), empleándose para el cálculo la siguiente fórmula:

$$V \text{ (mm}^3\text{)} = \frac{\pi}{6} (L * W * H)$$

siendo L, W y H, longitud, anchura y altura, respectivamente.

Para llevar a cabo las medidas de largo y ancho del tumor se utilizó un vernier digital. Las mediciones siempre las tomó la misma persona con la finalidad de evitar variaciones en la forma de medición que pudieran alterar los datos tomados.

6.2.5 Cuantificación de los niveles plasmáticos de corticosterona y norepinefrina

Una vez finalizado el protocolo de estrés crónico, se sacrificaron los ratones por punción cardíaca terminal usando EDTA para impedir la coagulación de la sangre, siendo previamente anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina con una concentración de 100 mg/kg y 10 mg/kg de peso corporal, respectivamente (Flecknell 1993). La sangre obtenida se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, se recuperó y se realizaron alícuotas del plasma, almacenándose a -70°C hasta su utilización.

Los niveles de corticosterona y norepinefrina en plasma se cuantificaron por medio de ensayos de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) utilizando los kits Corticosterone EIA Kit (Enzo Life Sciences) y Mouse Noradrenaline ELISA kit (MyBiosource) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

En el caso de la corticosterona, se empleó un ELISA de tipo competitivo con un rango de detección de 32-20,000 pg/mL. De forma resumida, se agregaron 100 μL los estándares y las muestras por duplicado (así como los controles correspondientes), en una placa cubierta con anticuerpos IgG anti-oveja de burro. Se analizaron 3 muestras de cada grupo control y 9 muestras de los dos grupos portadores de tumor, realizándose una dilución 1:3 para llevar a cabo el ensayo. A continuación, se añadió 50 μL del anticuerpo con corticosterona conjugado a fosfatasa alcalina y 50 μL de un anticuerpo policlonal de cabra contra corticosterona, incubándose la placa durante 2 horas en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron 3 lavados y se agregaron 200 μL del sustrato, realizándose una incubación de 1 hora a temperatura ambiente sin agitación. Pasado este tiempo, se agregaron 50 μL de la solución Stop y se realizó la lectura de la densidad óptica a 405 nm en un lector de placas.

En el caso de la cuantificación de norepinefrina, se realizó un ELISA de tipo sandwich (double antibody sandwich) con un rango de detección de 15.6-1000 pg/mL. El anticuerpo unido a la placa es de tipo monoclonal contra la NE de ratón, mientras que el anticuerpo de detección es un anticuerpo policlonal etiquetado con biotina. En primer lugar, se agregaron 100 µL de los estándares y las muestras de plasma (dilución 1:10), incubándose a 37 °C por 90 minutos. Después de esto, se realizaron tres lavados, se añadieron 100 µL del anticuerpo biotinilado y se volvió a incubar 60 minutos a 37 °C. De nuevo se realizaron tres lavados para posteriormente añadir 100 µL del conjugado de la enzima (excepto en los pocillos blanco), incubándose otros 30 minutos. Finalmente, se realizaron cinco lavados consecutivos, se adicionaron 100 µL del sustrato correspondiente, se incubó a 37 °C durante unos 20-30 minutos, se añadió el reactivo C y se realizó la lectura de la DO a 450 nm, en un tiempo de 10 minutos.

6.2.6 Cuantificación de citocinas TH1/TH2/TH17 plasmáticas e intratumorales

Utilizando las muestras de plasma almacenadas a -70 °C se determinaron los niveles de las citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ y TNF- α por medio de citometría de flujo con el equipo (BD Accuri C6; Becton-Dickinson Biosciences, Ann Arbor, MI, USA) y utilizando el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, los datos obtenidos se analizaron con el programa FCAP Array Software V 3.0 (Soft Flow Hungary, Ltd., Pécs, Hungary).

Se analizaron tres muestras de plasma por cada grupo control y seis muestras de cada grupo portador de tumor (estrés crónico y reposo). Además, se analizaron tres muestras de lisado proteico intratumoral de cada grupo portador de tumor. Se emplearon 50 µL de plasma en cada caso (no siendo necesario realizar diluciones) y en el caso de las muestras tumorales, se emplearon 20 µg de proteínas.

En resumen, se realizó la preparación de los estándares (con una concentración de entre 20-5000 pg/mL) y las muestras. Posteriormente, se añadieron 50 µL de la mezcla de las perlas de captura a cada tubo de ensayo, 50 µL de cada estándar/muestra y 50 µL de ficoeritrina, y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de esto, se realizó un lavado con 1 mL buffer de lavado y se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 200 g. Finalmente, se aspira el sobrenadante con mucho cuidado, se añaden otros 300 µL del buffer de lavado y se resuspendieron las perlas, para la lectura en el citómetro de flujo.

6.2.7 Determinación del nivel de expresión de *VEGF*, *HIF-1α*, *VEGFR-2* e *IL-6* por PCR punto final

6.2.7.1 Extracción de RNA y retrotranscripción a cDNA

Se determinó la expresión génica de *VEGF*, *HIF-1*, *VEGFR-2* e *IL-6* en el tejido tumoral por PCR convencional o PCR punto final, teniendo como control endógeno la β-actina. Tras realizar la punción cardiaca terminal, se extrajeron los tumores, se pesaron y se fragmentaron, siendo lavados en PBS y posteriormente, congelados en hielo, para ser transferidos a viales de 1.5 mL y almacenados a -70 ° C hasta el momento de su utilización. Para llevar a cabo la extracción del RNA del tejido tumoral se empleó la técnica de *Chomczynski* (Chomzynski y Sacchi 1987). Se agregaron 50-100 mg de tejido tumor a viales con 1 mL de TRIzol (Thermo Fisher Scientific) y se homogeneizaron con pistilos estériles. Se incubaron las muestras 5 minutos a temperatura ambiente y se añadió 0.2 mL de cloroformo. Se agitaron los viales durante unos 15 segundos y se dejaron incubar 2-3 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente, realizar una centrifugación a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Más tarde, se extrajo la fase acuosa y se adicionó 0.5 mL de isopropanol, seguido de una incubación de 10 minutos. A continuación, se volvió a centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos en frío, se volcó el sobrenadante y se añadió 1 mL de etanol al 70 % en cada vial. Se realizó una última centrifugación durante 5 minutos a 7,500 rpm a 4°C, después de la cual se volcó el sobrenadante y se dejaron secar los tubos boca abajo, sobre un papel.

Por último, se resuspendió el pellet agregando 30 µL de agua libre de nucleasas e incubando las muestras a 56°C durante 15 minutos en un Thermomyxer y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Posteriormente, se cuantificó la concentración de RNA obtenido por medio de la utilización de Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Para ello, las muestras se diluyeron 1:10 y teniendo en cuenta los valores resultantes de concentración de RNA se ajustó la cantidad necesaria para la reacción de retrotranscripción.

El siguiente paso fue la retrotranscripción de RNA a cDNA, para lo que se empleó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Part N° 4368814, Lot N° 1502204). En cada reacción de un volumen final de 20 µL se cargaron 2 µg de RNA de cada una de las muestras tumorales (en un volumen final de 10 µL), 2 µL de 10X RT buffer, 0.8 µL de 25X dNTP Mix (100 mM), 2 µL de 10X RT Random Primers, 1 µL de MultiScribe Reverse Transcriptase, y 4.2 µL de agua libre de nucleasas. Las condiciones de reacción utilizadas fueron las siguientes: 25 °C (10 minutos), 37 °C (120 minutos), 85 °C (5 minutos) y 4 °C (∞). Una vez finalizada la retrotranscripción, el cDNA se almacenó a -20°C.

6.2.7.2 PCR punto final

A continuación se muestran los primers (Tabla 2) que se utilizaron para cada uno de los genes de interés, así como del control endógeno.

GEN	Forward primer	Reverse primer	Tamaño (pb)
<i>β-actina</i>	GACATGGAGAAGATCTGGCA	GGTCTTTACGGATGTCAACG	161
<i>HIF-1</i>	CAAAACACACAGCGAAGC	TCAACCCAGACATATCCACC	437
<i>VEGF-A</i>	GCGGGCTGCCTCGCAGTC	TCACCGCCTTGGCTTGTCAC	716
<i>VEGFR2</i>	TCAGGCATCAGTGCAG	GACCTGTAGTCCATAGGCT	155
<i>IL-6</i>	AGTGGCTAAGGACCAAGACC	GCACTAGGTTTGCCGAGTAGA	102

Tabla 2. Lista de los primers empleados para realizar los ensayos de PCR punto final.

Condiciones de primers para gen *VEGF*:

- 2X Master Mix (GoTaq Green Master Mix, 2x, Promega, Lot. 0000135273): 5 μ l
- Forward primer (10 μ g/ μ l): 0.3 μ l
- Reverse primer (10 μ g/ μ l): 0.3 μ l
- cDNA (100 ng/ μ l): 1 μ l
- H₂O libre de nucleasas: 3.4 μ l

Volumen final de reacción: 10 μ l

Programa: 94°C 4 min; 94°C 30 seg; 59.2°C 30 seg; 72°C 30 seg; 72°C 4 min (30 ciclos).

Condiciones de primers para gen *HIF-1 α* :

- 2X PCR Master Mix: 5 μ l
- Forward primer (100 ng/ μ l): 1 μ L
- Reverse primer (100 ng/ μ l): 1 μ L
- cDNA (100 ng/ μ l): 1 μ l
- H₂O libre de nucleasas: 2 μ l

Volumen final de reacción: 10 μ l

Programa: 94°C 4 min; 94°C 30 seg; 54°C 30 seg; 72°C 30 seg; 72°C 4 min (30 ciclos).

Condiciones de primers para genes *β -actina*, *VEGF-R2* e *IL-6*:

- 2X PCR Master Mix: 5 μ l
- Forward primer (10 μ g/ μ l): 0.5 μ L
- Reverse primer (10 μ g/ μ l): 0.5 μ L
- cDNA (100 ng/ μ l): 1 μ l
- H₂O libre de nucleasas: 3 μ l

Volumen final de reacción: 10 μ l

Programa: 94°C 4 min; 94°C 30 seg; 60°C 30 seg; 72°C 30 seg; 72°C 4 min (30 ciclos).

Tras la finalización de la PCR punto final, las muestras se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1%, con buffer SB 1X, a 150 V durante 35 minutos.

Para la preparación del gel de agarosa 1 % se empleó 1 g de agarosa en 100 mL de buffer SB y se calentó en el microondas (potencia media, 1.5 minutos) hasta que se disuelve completamente.

Para la preparación del buffer SB (borato de sodio) 1X, se partió de un stock de buffer SB 50 X (20 g NaOH, 120 g H₃BO₃ en un litro de agua destilada), se tomaron 20 mL de buffer SB 50X y 980 mL de agua destilada para tener 1 litro de buffer SB 1X, siendo esta la solución de trabajo.

El marcador empleado fue el marcador de 100 pb (Promega, G210A). Se utilizaron 5 µL del marcador y 1 µL de buffer de carga. Posteriormente, el gel se tiñó en bromuro de etidio durante 20 minutos y se observaron los resultados obtenidos en un transiluminador (UV Transilluminator Model M-20, UVP). Para la preparación del bromuro de etidio, se tomaron 20 µL de bromuro de etidio concretado y se disolvieron en 500 mL de agua destilada.

Se tomaron fotografías de los resultados y posteriormente, se llevó a cabo un análisis por densitometría empleando el procesador de imágenes ImageJ, así como un análisis estadístico (ANOVA de una vía).

Para llevar a cabo el análisis de densitometría, se analizaron las imágenes de los geles invirtiendo los colores. Se midió el área de cada muestra de PCR, se calculó el porcentaje que representa cada una y se normalizaron los datos. Posteriormente, se compararon los datos de cada uno de los genes en comparación con el gen control, β -actina. Esto se hizo para las muestras de condiciones normales y muestras bajo estrés crónico. Finalmente, se calculó un nuevo ratio, comparando los resultados de las muestras de estrés crónico sobre los controles, es decir, las muestras de reposo.

Por último, se realizó un análisis ANOVA de una vía para determinar posibles diferencias en el nivel de expresión génica de los genes de interés bajo las dos condiciones, estrés crónico y reposo.

6.2.8 Extracción de proteínas tumorales

Para la extracción de proteínas tumorales se pesaron trozos de tumor de unos 50 mg aproximadamente y se homogeneizaron en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 0.1 %, SDS al 0.1 %, EDTA 1 mM) junto con inhibidores de proteasas (PMSF 10 mg/mL). Las muestras se dejaron incubando en hielo por medio hora y posteriormente, se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 minutos a 4 °C. A continuación, se conservó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C hasta el momento de utilización. La cuantificación proteica se realizó por medio de un ensayo colorimétrico (BioRad Protein Assay), determinándose la densidad óptica a 595 nm.

En caso de ser necesario, se realizó la concentración de las muestras de proteínas por medio de la precipitación con acetona. Para ello, se agregó acetona con una proporción de 4:1, con respecto a la muestra; se mezclaron los viales por medio de agitación por vórtex y se centrifugaron durante 10 minutos a 13,000 rpm. Posteriormente, se decantó la acetona, se dejó secar brevemente y se resuspendió el pellet con una solución de Tris-HCl 50 mM.

6.2.9 Análisis histológico del linfoma murino L5178Y-R en ratones estresados/no estresados.

Tras la finalización del protocolo de estrés crónico se llevó a cabo la extracción de los tumores formados en la extremidad posterior derecha de los ratones. Parte de las muestras obtenidas se incluyeron en una solución de formalina 10 % para realizar la fijación de los tejidos y posteriormente, se pasaron a una solución de etanol 70 % para su almacenamiento a largo plazo.

Para la realización de los estudios de histología de los tumores se contó con la colaboración del Dr. Armando Trejo, del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Los bloques fijados se incluyeron en parafina y se obtuvieron secciones del tejido de unas 5 µm de grosor utilizando un micrótopo, las cuales fueron montadas en laminillas, realizándose una tinción de hematoxilina y eosina.

Las secciones de tejido fijadas (no más de 0.5 cm de grosor) se colocaron en cassettes y se procesaron siguiendo el protocolo que se describe a continuación: etanol 70 %, 1 hora (2 cambios); etanol 80 %, 1 hora (2 cambios); etanol 95 %, 1 hora (2 cambios); etanol 100 %, 1 hora (3 cambios); xilol, 1 hora (3 cambios) y finalmente, inclusión en parafina (56-68 °C), 1.5 horas (2 cambios).

Los bloques obtenidos se cortaron en secciones de 5 µm utilizando un micrótopo y posteriormente, se pasaron a un baño de agua a 37 °C para ser montadas sobre los portaobjetos. Después de esto, se calentaron a 65 °C durante 20 minutos y los portaobjetos se almacenaron a temperatura ambiente toda la noche. Después de eso, se realizó una tinción de hematoxilina y eosina. En primer lugar se procedió a la rehidratación de las secciones por medio del siguiente protocolo: xilol, 10 minutos (2 cambios); etanol 100 %, 3 minutos (2 cambios); etanol 95 %, 3 minutos (2 cambios); enjuagar con agua destilada; tinción con solución de hematoxilina, 8 minutos; lavado con agua corriente, 5 minutos; alcohol ácido 1 %, 30 segundos; lavado con agua corriente; tinción con eosina, 2 minutos y finalmente, deshidratar y montar.

Tras el procesamiento de las muestras, las laminillas con los cortes histológicos de tumores de ratones que fueron sometidos a estrés crónico y de ratones que permanecieron en reposo se observaron al microscopio a ampliaciones de 4X, 10X, 20X y 40X, y se analizaron las características histológicas y patológicas de las muestras tumorales. Posteriormente, se tomaron fotografías de los aspectos más significativos en cada caso.

6.2.10 Análisis estadístico:

Para el análisis estadístico se utilizó una prueba ANOVA de una vía, y la prueba de Tukey para la comparación de medias, en aquellos casos en los que hubo diferencias entre los grupos experimentales. Se emplearon los programas Origin y SPSS, para la realización de gráficas y el análisis estadístico.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Evolución del peso corporal e índice de masa corporal

Uno de los principales indicadores de los efectos del estrés crónico es la pérdida o no ganancia de peso corporal, ya que bajo condiciones de estrés tienen lugar cambios metabólicos en el organismo. Por ello, se midió el peso corporal de los ratones en el día inicial del protocolo o día 0, así como en los días 7, 12, 15, 20 y 23 y a continuación, se muestran los resultados obtenidos en forma de porcentaje de variación de peso en la Figura 3, tomando como 100 % el peso inicial.

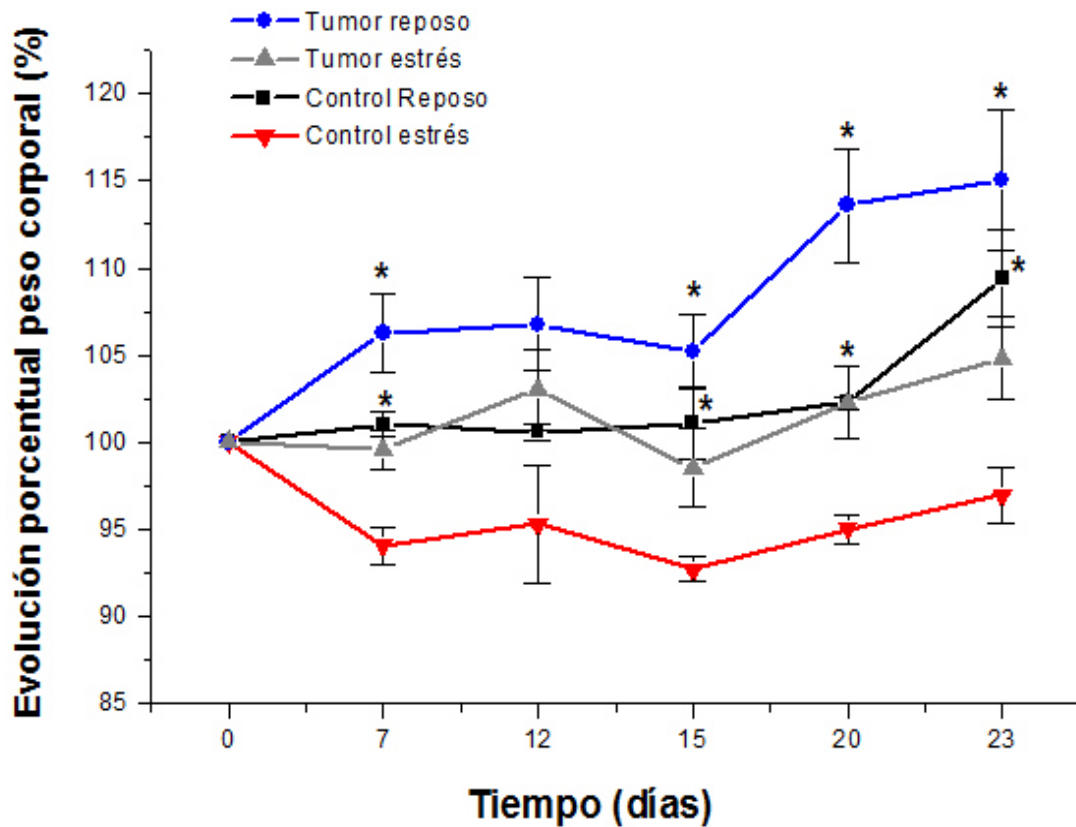


Figura 3. Evolución del peso corporal de los cuatro grupos experimentales durante los 24 días de duración del protocolo de estrés crónico.

Dentro de los grupos controles (no portadores de tumor), el grupo sometido a estrés crónico no tuvo un incremento de peso, sino que sufrió una pérdida de peso aproximadamente del 5 %. En cambio, los ratones que permanecieron en las condiciones normales de alojamiento sí que tuvieron un incremento del peso corporal, especialmente en la fase final del protocolo, dándose un incremento de en torno a un 5-7 %.

Se realizó una prueba ANOVA de una vía para comparar el porcentaje de variación de peso entre ambos grupos durante los distintos días en los que se determinó el peso, y se observó un incremento de peso significativamente mayor ($p < 0.05$) en el grupo que permaneció en reposo, a excepción del día 12, en el que no hubo diferencia significativa. Los valores de p obtenidos en cada caso fueron los siguientes: Día 7: $p = 0.005$; día 12: $p = 0.02$; día 15: $p = 0.01$; día 20: $p = 0.001$; día 23: $p = 0.01$.

Este mismo patrón de variación del peso se observa en los grupos portadores de tumor. Los ratones portadores de tumor sometidos a estrés crónico mantuvieron un peso similar tras 7 días del protocolo, incrementándose ligeramente (3 % aproximadamente) al final del protocolo.

En cambio, aquellos ratones portadores de tumor que no fueron sometidos a estrés crónico presentaron un incremento de peso de un 5 % durante la primera mitad del protocolo, alcanzándose un incremento medio del 15 % en los días finales del protocolo.

De igual manera, se realizó un análisis estadístico de ANOVA de una vía, para comparar la evolución del peso de ambos grupos portadores de tumor, obteniéndose una variación de peso significativamente mayor en los ratones que permanecieron en reposo ($p < 0.05$). Los valores de p obtenidos para cada uno de los días son los siguientes: día 7: $p = 0.01$; día 12: $p = 0.29$; día 15: $p = 0.04$; día 20: $p = 0.01$; día 23: $p = 0.04$.

También se comparó la evolución del peso entre ratones portadores de tumor y controles, bajo condiciones de reposo, y no se encontraron diferencias significativas entre ambos.

Por tanto, se observa que efectivamente el paradigma de estrés empleado tuvo un efecto sobre el peso corporal siendo esto una evidencia de la inducción de estrés crónico en los ratones.

Otro importante indicador de los efectos del estrés sobre el organismo es el índice de masa corporal (IMC, g/cm^2). Por ello, se determinó el índice de masa corporal en los cuatro grupos experimentales al final del protocolo de estrés crónico. En los grupos control, el IMC del grupo de reposo fue de $0.35 \text{ g}/\text{cm}^2$, mientras que en reposo fue de $0.31 \text{ g}/\text{cm}^2$. Los grupos portadores de tumor presentaron un IMC de $0.37 \text{ g}/\text{cm}^2$ y $0.35 \text{ g}/\text{cm}^2$, respectivamente en reposo y estrés. Por tanto, podemos decir que se observó un IMC significativamente menor ($p < 0.05$) en ambos grupos sometidos a estrés (control y portador de tumor), en comparación con los de reposo, siendo esto otro indicativo de los efectos sobre el organismo del estrés crónico inducido (Figura 4).

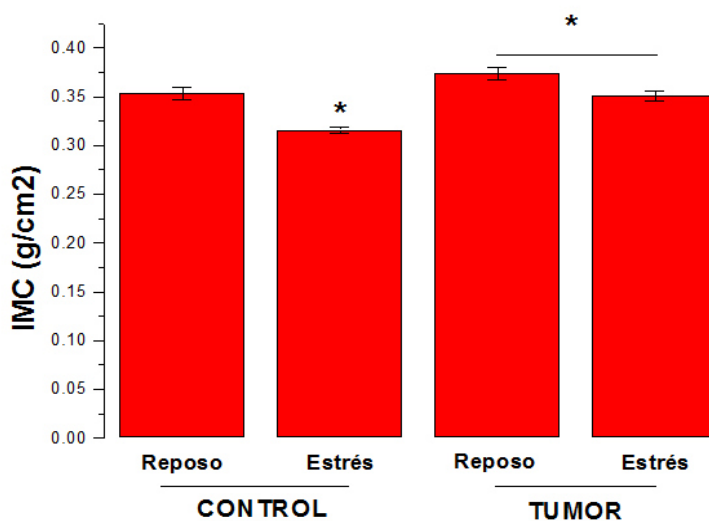


Figura 4. Representación de los valores de IMC de los 4 grupos experimentales al final del protocolo de inducción de estrés crónico. Puede observarse que se dio un menor índice de masa corporal en los grupos bajo estrés crónico ($p < 0.05$) que en condiciones de reposo.

7.2 Peso y volumen tumoral

Con el objetivo de determinar la evolución del peso y volumen tumoral, se tomaron medidas de la extremidad posterior derecha (largo y ancho) en distintos días a lo largo del experimento y tras haber sido inoculado el tumor en el día 1 del protocolo.

En cuanto al peso tumoral (Figura 5) no se observaron diferencias significativas entre los grupos de estrés y reposo en el día 7; siendo hasta el día 12, cuando observamos un peso tumoral significativamente mayor ($p=0.01$) en el grupo sometido a estrés crónico (1430 \pm 94.8 mg) que en el de reposo (962 \pm 146.7 mg). También en el día 15, se observó un mayor peso tumoral en condiciones de estrés crónico ($p<0.05$).

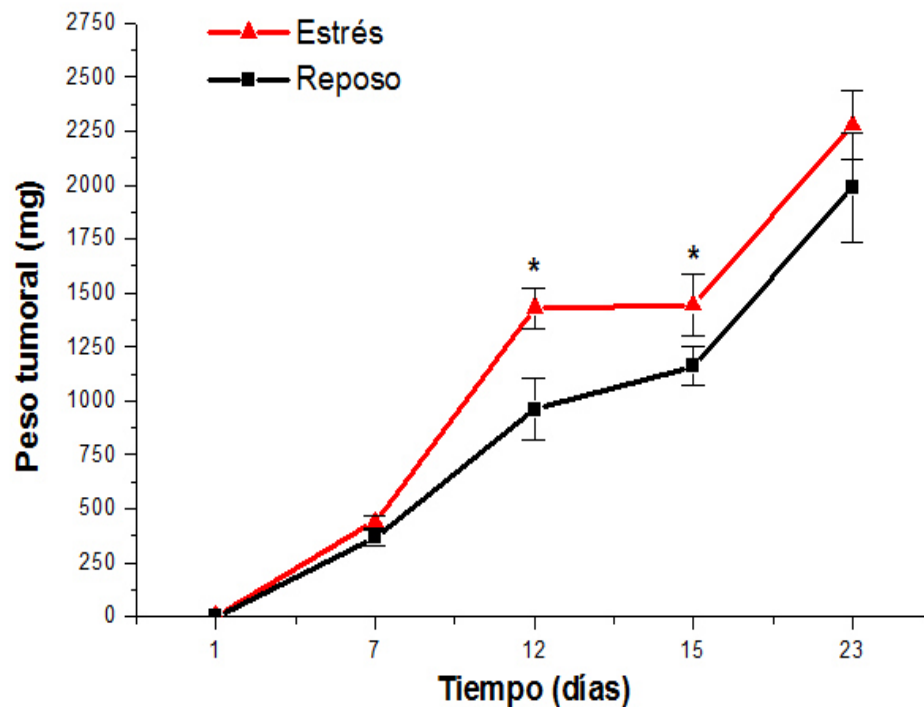


Figura 5. Evolución del peso tumoral (mg) estimado bajo estrés crónico y reposo durante el protocolo de inducción de estrés crónico.

Sin embargo, al final del protocolo, no se observó una diferencia significativa en el peso tumoral estimado entre las condiciones de estudio, con un peso tumoral de 2278.1 ± 162.5 mg bajo estrés crónico, frente a 1989.1 ± 250.8 mg en reposo. Esto podría deberse a que el protocolo de estrés crónico empleado sólo tiene una duración de 30 minutos, lo que cual no es demasiado agresivo y puede que no sea suficiente para generar una mayor progresión del tumor. Además de esto, debido a la localización del tumor, en la extremidad posterior derecha, esto supone una limitación en cuanto al tamaño máximo que puede alcanzar el tumor, sin que se comprometa la movilidad y bienestar de los ratones. A pesar de lo anterior, sí que es posible observar que se da una progresión más rápida del tumor en presencia de estrés crónico, como se vio en los días 12 y 15.

En cuanto a la evolución del volumen tumoral estimado (Figura 6), se observó una progresión similar al peso tumoral. En el día 12, hubo un volumen significativamente mayor en el grupo bajo estrés crónico ($1137.47 \pm 112.37 \text{ mm}^3$) que en condiciones de reposo ($772.8 \pm 140.75 \text{ mm}^3$).

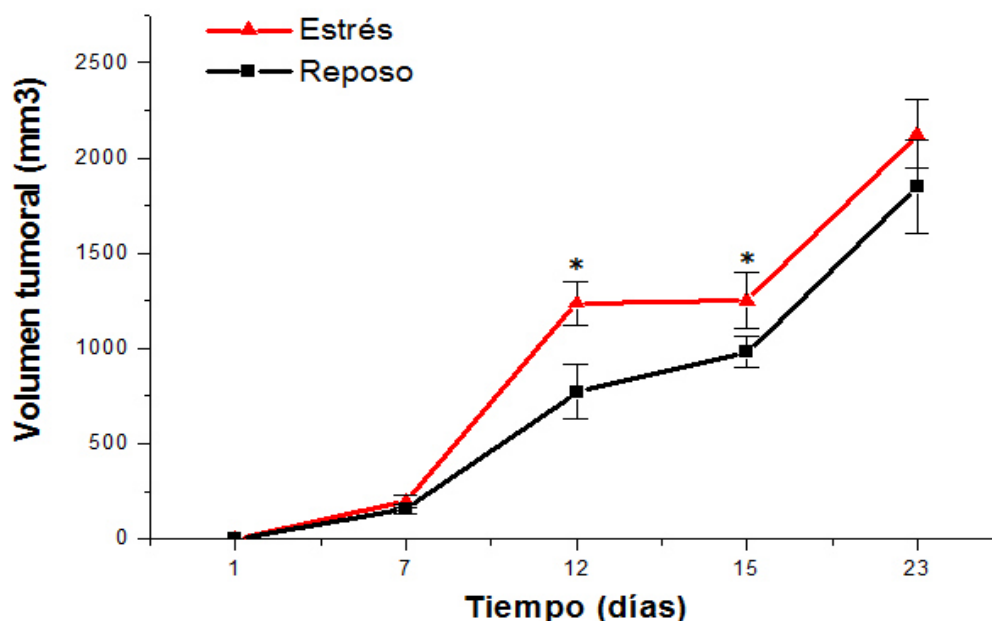


Figura 6. Evolución del peso volumen tumoral en los grupos bajo estrés crónico y reposo a lo largo de los 24 días del experimento.

En el caso del día 15, se dio un volumen mayor bajo estrés crónico ($1251.7 \pm 147.2 \text{ mm}^3$) que en reposo ($980.1 \pm 70.7 \text{ mm}^3$). En cambio, al final del protocolo, y al igual que sucedió con el peso tumoral, no se observaron diferencias significativas entre las dos condiciones de interés ($2124.6 \pm 180 \text{ mm}^3$, frente a $1848 \pm 246.4 \text{ mm}^3$).

Una vez finalizado el protocolo, se extrajeron los tumores de la extremidad posterior derecha y se pesaron de manera individual.

En la Figura 7, se muestra el peso tumoral final medio de ambos grupos: $5.53 \pm 0.44 \text{ g}$ en reposo, frente a $5.12 \pm 0.68 \text{ g}$ en condiciones normales de alojamiento. Al igual que sucedió con las estimaciones de peso y volumen, en este caso tampoco se obtienen diferencias significativas entre los grupos de estrés y reposo.

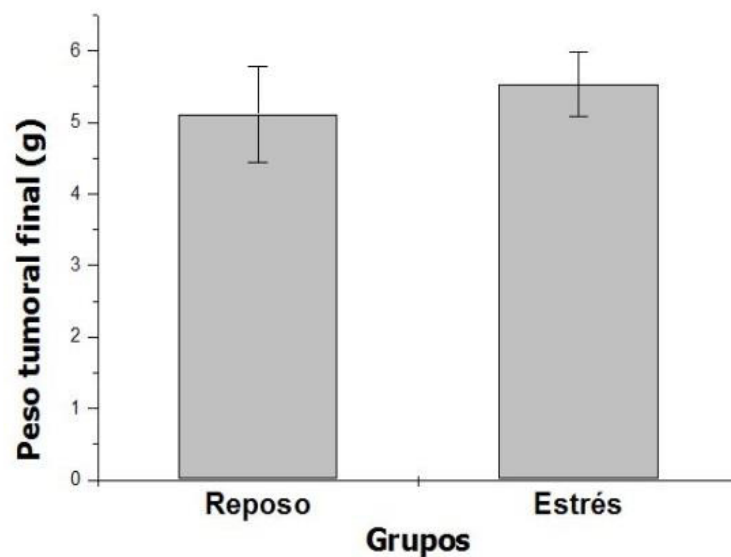


Figura 7. Representación del peso tumoral final medio de los grupos portadores de linfoma.

Además de las características propias del modelo, esto también puede ser debido a que el paradigma de estrés empleado es relativamente suave, teniendo una duración de 30 minutos como máximo. Como consecuencia, aunque sí hay efectos sobre el peso corporal causados por el estrés, esto no llega a observarse en cuanto al tamaño tumoral.

A continuación, se muestran fotografías tomadas a los tumores justo después de la extracción y pesado, de ratones bajo estrés crónico y reposo (Figura 8).

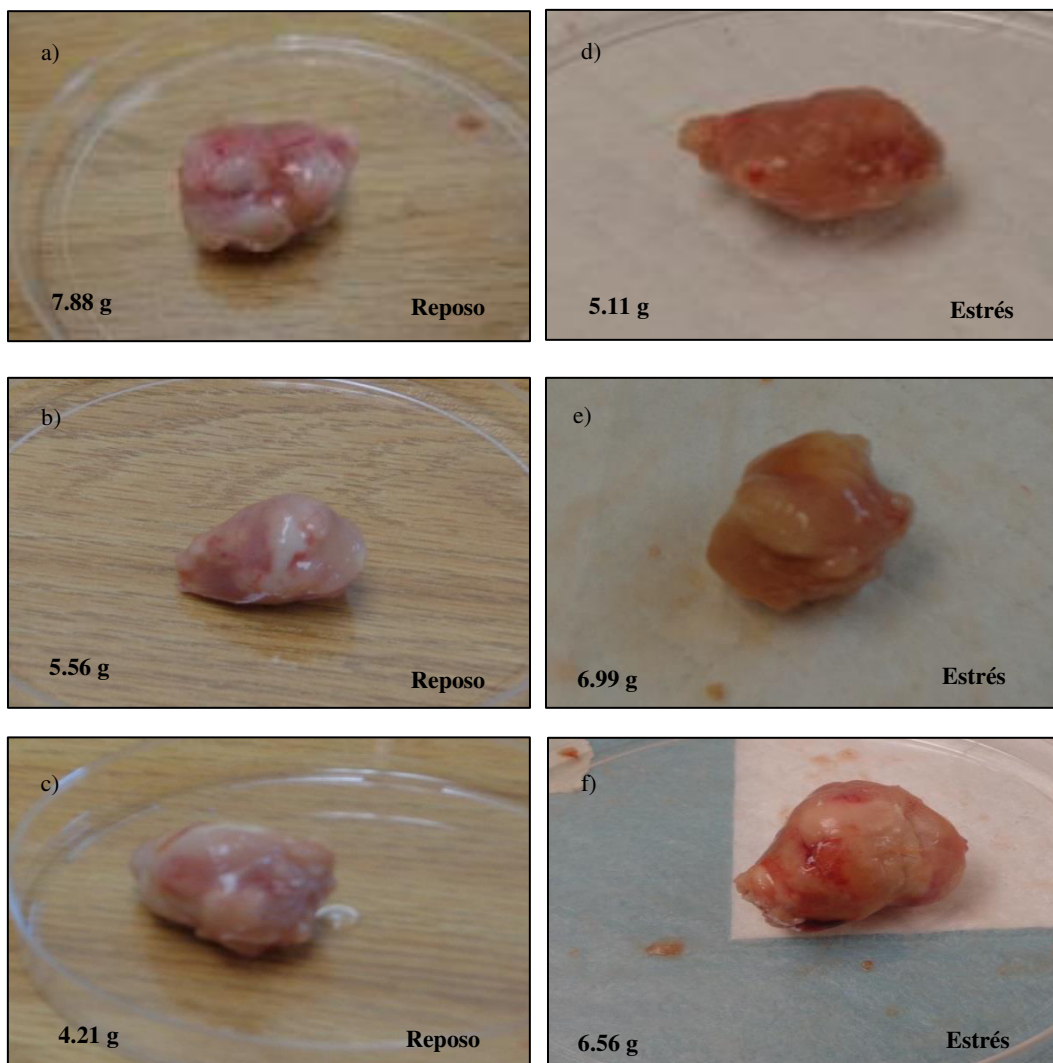


Figura 8. En las imágenes a, b y c se muestran tres de los tumores extraídos del grupo de ratones en reposo, mientras que en las imágenes d, e y f, se muestran tres de los tumores de ratones bajo estrés crónico.

7.3 Prueba de preferencia por sacarosa o prueba de anhedonia

Con el objetivo de determinar posibles cambios anímicos en los ratones Balb/c como consecuencia del protocolo de inducción de estrés crónico empleado, se utilizó la prueba de preferencia por sacarosa. Tras una adaptación inicial, se realizó la prueba de manera semanal, en los días 7, 14 y 21 del protocolo, midiendo el volumen tomado de agua y sacarosa a las 24 y 48 horas. Se considera que un porcentaje menor al 60-65 % de preferencia por sacarosa es un indicativo de anhedonia (o estado depresivo), mientras que en ratones sanos se espera una preferencia por sacarosa en torno al 80 % (Chiba et al. 2012; Pothion et al. 2004).

En la prueba realizada en la semana 1 (Figura 9A), el porcentaje de preferencia por sacarosa a las 24 horas en los grupos control, fue de 48.5 % en reposo y 48.6 % en estrés, mientras que en los grupos portadores de tumor fue de 66.7 % en ambos casos. A las 48 horas, el porcentaje de preferencia por sacarosa en los controles fue de 52 y 54 %, respectivamente en reposo y estrés, mientras que en los grupos con tumor, fue de 66.7 y 69.4 %. A pesar de que se obtuvieron valores inferiores al 80 %, esto no puede considerarse como indicador de anhedonia ya que es la primera prueba realizada y probablemente, aún no hubo una adaptación completa de los ratones a la presencia de sacarosa.

En la segunda prueba realizada (Figura 9B), se pudo observar que a las 24 horas, en el grupo control bajo estrés se dio la mitad de preferencia por sacarosa (45.4 %) que en reposo (90.4 %), mientras que a las 48 horas estos valores fueron más similares, con un 69.2 y 81.4 %, respectivamente. En el caso de los grupos portadores de tumor, la preferencia por sacarosa a las 24 horas fue de 90.5 y 68.4 % en reposo y estrés, y de 82.1 y 87.3 % a las 48 horas. Por lo tanto, tampoco en la segunda semana se pudo determinar una menor preferencia por sacarosa en condiciones de estrés crónico, que sea indicativa de un estado de anhedonia o depresión en los ratones.

Por último, en la tercera semana (Figura 9C), se determinaron valores de preferencia por sacarosa superiores a las dos semanas anteriores, dándose a las 48 horas un % de preferencia por sacarosa superior a 75 % en los cuatro grupos experimentales.

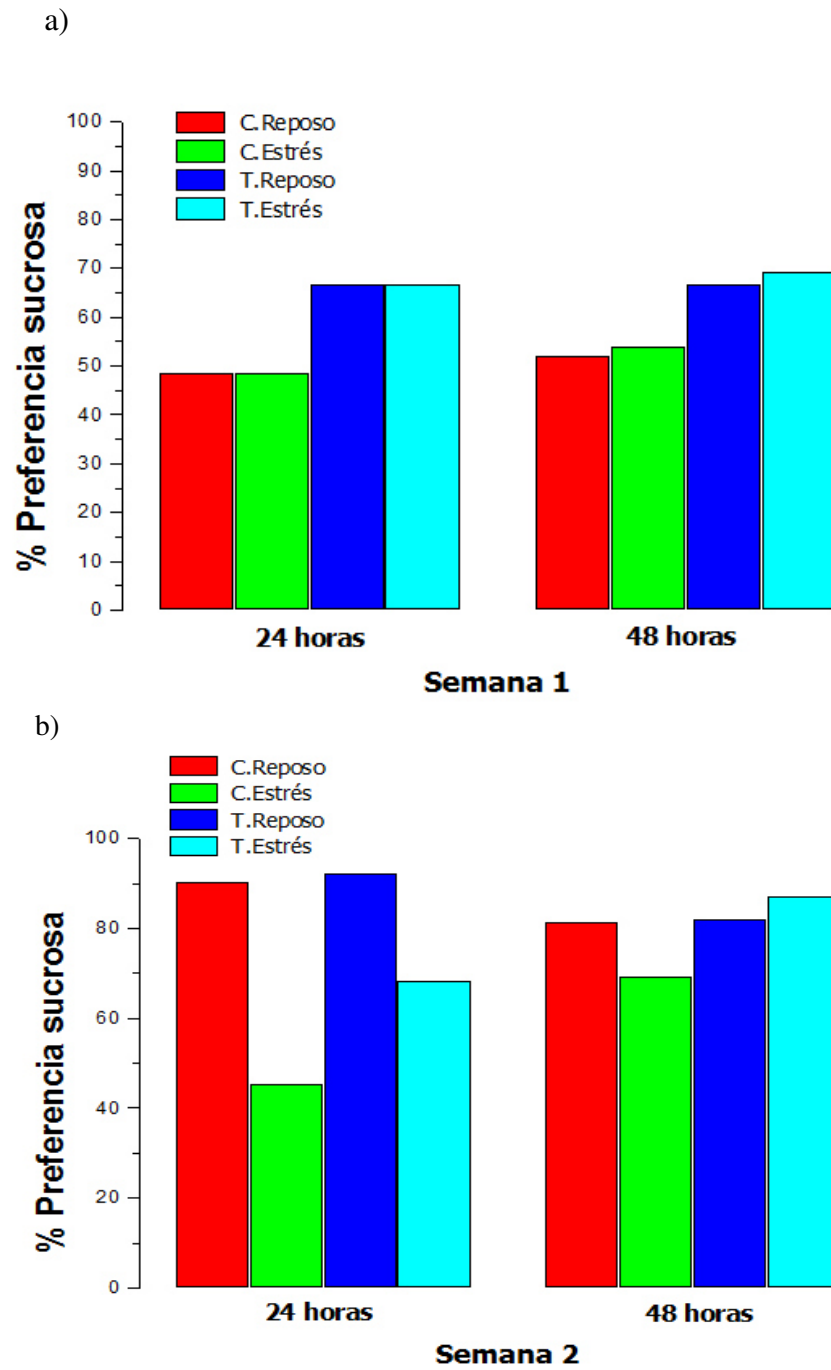


Figura 9. Se muestran los resultados obtenidos en la prueba de preferencia por sacarosa, de los días 7 (Figura 9A), 14 (Figura 9B) y 21 (Figura 9C), a las 24 y 48 horas.

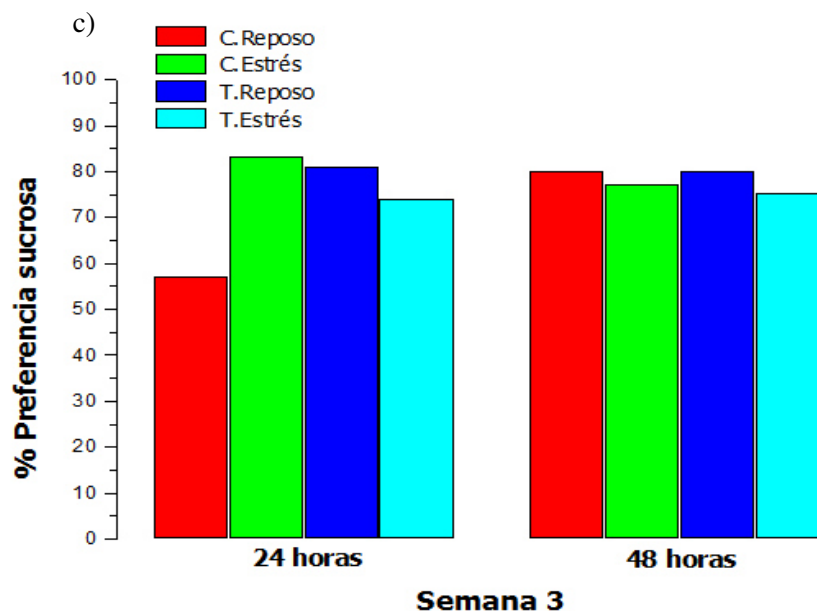


Figura 9. Se muestran los resultados obtenidos en la prueba de preferencia por sacarosa, de los días 7 (Figura 9A), 14 (Figura 9B) y 21 (Figura 9C), a las 24 y 48 horas.

La anhedonia es la falta de interés en un estímulo de recompensa, por lo que lo normal sería encontrar una preferencia por una bebida dulce, mientras que si eso no se produce sería indicativo de anhedonia/depresión.

En general, los resultados obtenidos no muestran un estado de anhedonia en los ratones producido por el estrés crónico. Esto puede deberse a que el estrés inducido es no es lo suficientemente agresivo como para generar depresión. Además, hay antecedentes que muestran que es la anhedonia (y no el estrés crónico) la que se asocia con síntomas de la depresión, como son un mayor tiempo de flotación durante el nado forzado y menor exploración, es decir, que el estrés crónico no siempre está asociado con estado de anhedonia. Por otro lado, se ha visto previamente que una mayor ansiedad y pérdida de peso corporal fueron consecuencias del estrés crónico, independientemente de la anhedonia (Strekalova 2004).

7.4 Niveles plasmáticos de las principales hormonas del estrés: corticosterona y norepinefrina

En presencia de estrés crónico tiene lugar la activación de dos vías principales en el Sistema Nervioso, el eje HPA y el Sistema Nervioso Simpático, dándose lugar a la producción de corticosterona y norepinefrina, respectivamente, entre otras hormonas. Por ello, una vez finalizado el protocolo de estrés crónico, se cuantificaron los niveles plasmáticos de corticosterona por ensayo de ELISA comercial. Se determinó la producción de corticosterona en los grupos control (n=3, por duplicado) y en los grupos portadores de tumor (n=5, por duplicado).

En los grupos controles se determinó una concentración media de 37.2 ± 4.5 ng/mL en los ratones que permanecieron en las condiciones normales de alojamiento, y de 38.9 ± 9.7 ng/mL bajo estrés crónico (Figura 10). Por lo tanto, en el grupo de ratones que fueron sometidos al protocolo de inducción del estrés crónico no se observó una mayor producción plasmática de corticosterona tras 24 días.

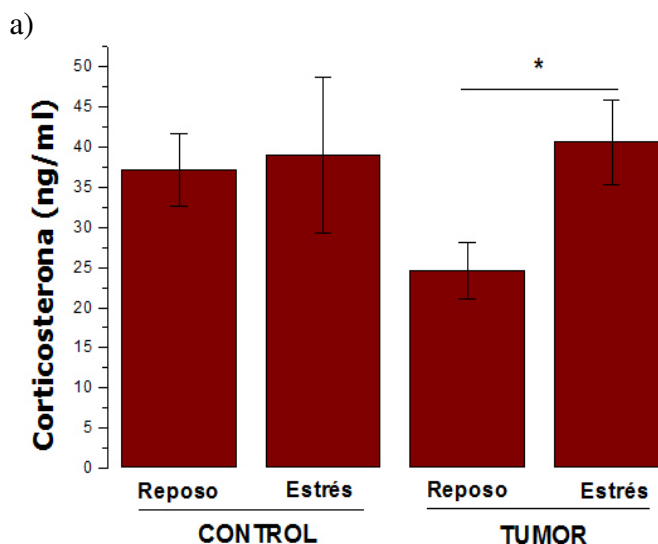


Figura 10. Niveles plasmáticos de corticosterona (ng/mL) determinados por ELISA, tras la realización del protocolo de inducción de estrés crónico, en los grupos controles y portadores de tumor (en condiciones de reposo y bajo estrés crónico).

Esto puede deberse a que hubo una regulación negativa del eje HPA tras los 24 días de protocolo, es decir, que la inducción del estrés crónico no fue suficiente como mantener elevados los niveles de corticosterona tras un protocolo de 24 días. Para llevar a cabo la elección del tipo de paradigma de estrés, nos basamos en antecedentes como, Zamora et al. 2013, donde reportaron un nivel elevado de corticosterona en el grupo de ratones estresados con respecto al grupo control, indicando que esto puede deberse a un fallo en el mecanismo de retroalimentación negativo del eje HPA. Sin embargo, en nuestro experimento no se observó esto.

Otro factor a tener en cuenta, es el ciclo circadiano de la corticosterona, ya que la hora del día en la que se lleva a cabo el sacrificio y la toma de muestras, podría afectar en los resultados finales, debido las variaciones diarias en la concentración de esta hormona.

En cuanto a los ratones portadores de tumor, sí que se observó una producción significativamente mayor ($p=0.035$, t de Student) de corticosterona en los ratones a los que se indujo estrés crónico (40.6 ± 5.2 ng/mL) con respecto a los que permanecieron bajo las condiciones normales de reposo (24.6 ± 3.5 ng/mL).

El hecho de que sí hubiera una mayor activación del eje HPA en forma de producción plasmática de corticosterona en condiciones de presencia de tumor en el organismo, pero no en ratones sanos (ausencia de tumor), puede deberse a que el propio tumor, por su presencia en el organismo, esté generando esta respuesta.

Esto puede deberse a que como se trata de un protocolo de estrés crónico, es decir, de larga duración, y debido a que método empleado para inducir estrés crónico no es demasiado intenso, llega un momento en que se regula el eje HPA por un mecanismos de retroalimentación negativa. Además, otra variable que es necesario tomar en consideración es que el nivel de corticosterona en las hembras puede fluctuar según el punto del ciclo estral, por lo que sería importante regular esta variable en próximos experimentos, así como realizar estos estudios en ratones machos, para evitar estas posibles influencias hormonales y determinar posibles variaciones debidas al sexo de los animales.

Otra de las principales hormonas liberadas en respuesta al estrés es la norepinefrina (NE). Se realizó la cuantificación de NE en plasma en ratones de los cuatro grupos experimentales tras la finalización del protocolo.

En primer lugar, en los grupos control (reposo o estrés) no se observaron diferencias significativas ($p=0.14$), dándose una producción media de 106.5 ± 3.77 pg/mL en condiciones de reposo y de 146.1 ± 21.7 pg/mL en los ratones bajo estrés crónico (Figura 11). Al igual que lo observado anteriormente en los resultados de corticosterona, tampoco se observó un incremento significativo de NE tras la realización del protocolo.

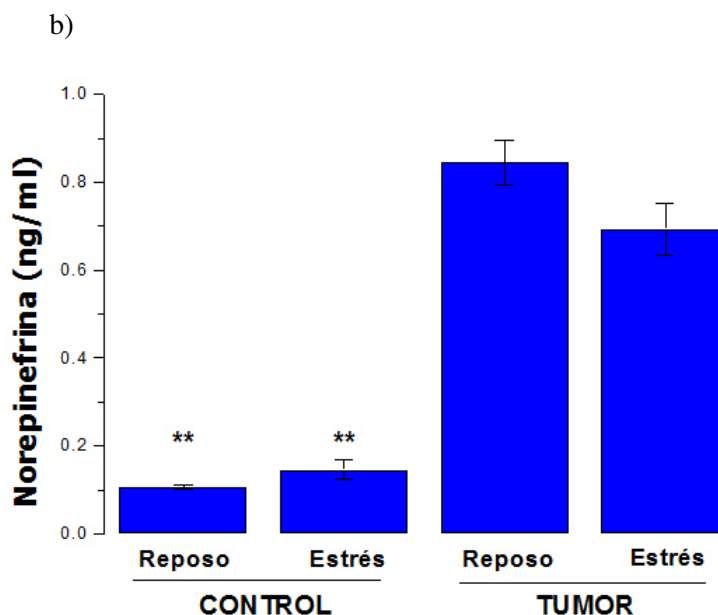


Figura 11. Cuantificación de los niveles plasmáticos de norepinefrina por ensayo de ELISA, en los grupos control (sin tumor) y portadores de tumor, bajo reposo y estrés crónico.

En cuanto a los grupos portadores de tumor, se determinó una concentración de 845.4 ± 52.1 pg/mL en ratones en reposo, y de 693.4 ± 59.9 pg/mL en el grupo bajo estrés crónico, no habiendo una diferencia significativa entre ambos grupos ($p=0.09$).

Se realizó un análisis de ANOVA de una vía, dándose diferencias significativas entre los grupos controles y los grupos portadores de tumor ($p=2.28E-6$) dándose una concentración de NE en plasma 7-8 veces mayor en los grupos con tumor que en los animales sanos.

Existen antecedentes de protocolos de restricción del movimiento y nado forzado en los que reportó una diferencia significativa en los niveles de NE a los 14 días, pero no tras los 21 o 28 días, como es nuestro caso, pudiendo esto deberse a un bucle de regulación hormonal en la que participa la corticosterona (Zamora et al. 2013). Esto parece indicar, que la diferencia en el nivel de NE plasmática, no se debió tanto a la inducción o no del estrés crónico como a la presencia de un tumor en el organismo, ya que éste es una forma de estrés en sí mismo, pudiendo estimular la producción de hormonas del estrés en el microambiente tumoral (Jobling et al. 2015).

7.5 Cuantificación de citocinas Th1, Th2 y Th17 en plasma y tumor

7.5.1 Niveles plasmáticos de citocinas Th1, Th2 y Th17

Con el objetivo de obtener información sobre posibles cambios en el sistema inmune a nivel sistémico, se determinó la producción de citocinas de tipo Th1, Th2 y Th17 en plasma por medio de citometría de flujo. Se cuantificaron las citocinas IL-10, IL-6, IFN-gamma, IL-4, IL-2 e IL-17, siguiendo las instrucciones indicadas en el kit y los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

Con respecto a la IL-10, no se detectó en ninguna de las muestras, por lo que no se muestra la gráfica correspondiente a esta citocina. Esto podría deberse a que el límite inferior de detección para esta citocina en el kit de citometría de flujo es de 16.8 pg/mL, siendo un valor considerablemente mayor que para el resto de las citocinas. Por ello, cabe la posibilidad de que en las muestras estudiadas sí estuviera presente IL-10 pero en una concentración menor al límite de detección y que por esta razón no se haya detectado, o bien, que simplemente no haya estado presente.

En cuanto a IL-2 (Figura 12a), se realizó un análisis de ANOVA de una vía y no se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos de experimentación ($p=0.26$), dándose unos valores medios de entre 5.80 ± 0.14 y 6.36 ± 0.31 pg/mL.

Con respecto a IL-4 (Figura 12b) tampoco se dieron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($p=0.76$), con valores promedio de entre 4.92 ± 1.10 pg/mL y 5.66 ± 1.43 pg/mL. Por lo tanto, ni el estrés crónico ni la presencia del tumor pareció afectar la producción de esta citocina, al igual que sucede con IL-2. Es por esto que en este caso el protocolo de inducción de estrés utilizado no parece estar generando un cambio de respuesta Th1 a Th2 a nivel sistémico, a los 24 días de protocolo, como se esperaría, ya que la inmunosupresión es una de las principales características causadas bajo condiciones de estrés crónico.

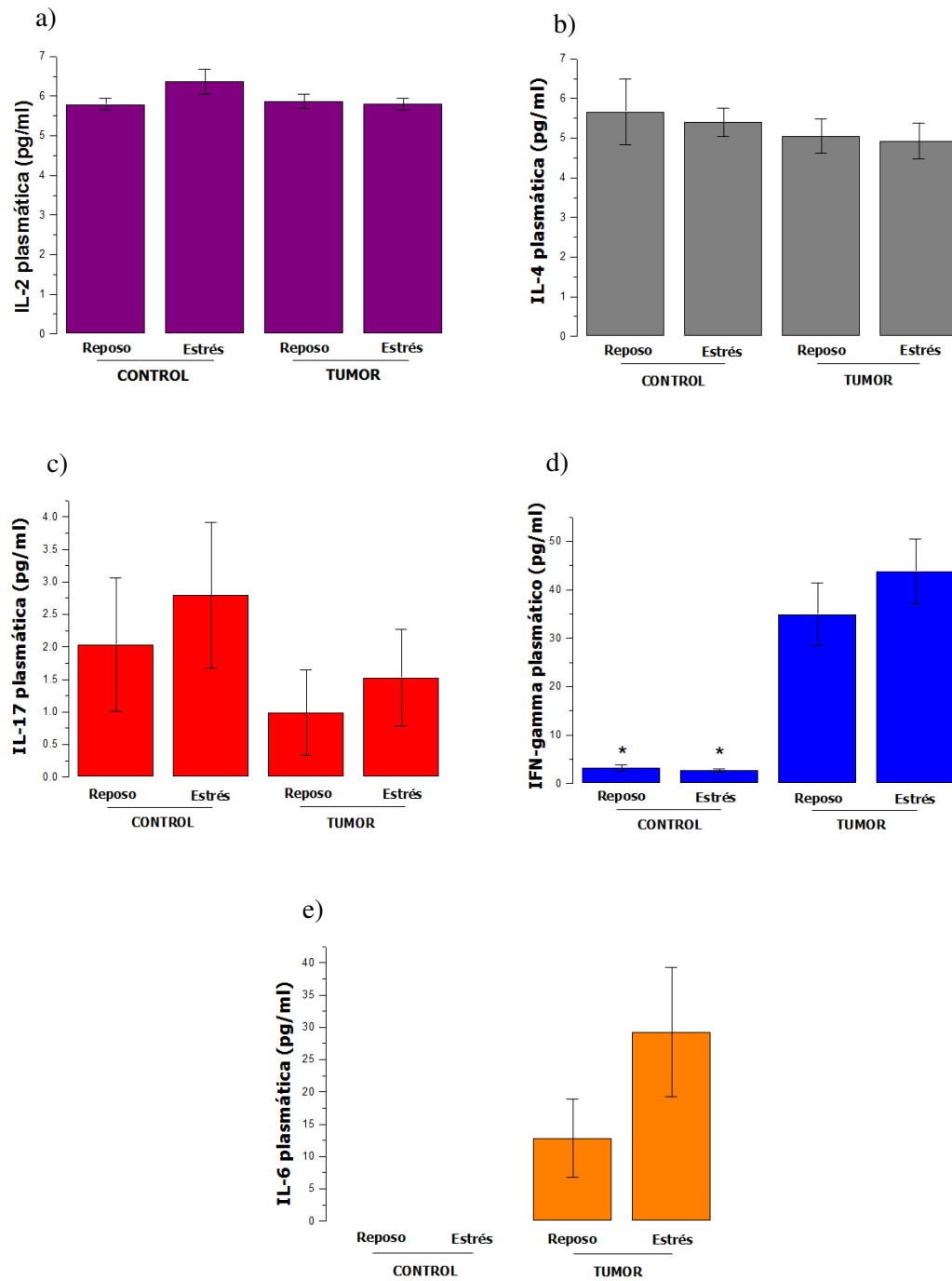


Figura 12. Cuantificación de los niveles plasmáticos de citocinas a) IL-2, b) IL-4, c) IL-17, d) IFN-gamma, e) IL-6 en los distintos grupos experimentales.

Los resultados obtenidos para la IL-17, una citocina generalmente pro-inflamatoria y con características pro-angiogénicas, se muestran en la Figura 12c. Se detectaron niveles muy bajos de esta citocina a nivel plasmático, dándose una concentración de 2.1 ± 1.0 pg/mL en el grupo control de reposo, y 2.8 ± 1.1 pg/mL en el grupo bajo estrés crónico. En el caso de los grupos con tumor se dio una concentración media de 0.99 ± 0.6 pg/mL en ratones con tumor bajo estrés y 1.5 ± 0.075 pg/mL en ratones con tumor en reposo, no dándose diferencias significativas entre los cuatro grupos experimentales ($p=0.53$).

En la Figura 12c, se muestran los resultados obtenidos para IFN-gamma. Los niveles plasmáticos de IFN-gamma en los ratones portadores de linfoma fueron significativamente mayores (43.9 ± 6.7 pg/mL bajo estrés crónico y 34.9 ± 4.4 pg/mL en condiciones de reposo) que en los controles (2.7 ± 0.24 y 3.2 ± 0.7 pg/mL, respectivamente), como indicó la prueba de ANOVA de una vía ($p=1.05 \times 10^{-5}$).

Por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre las condiciones de estrés crónico y reposo, ni en los controles ($p=0.41$) ni en los ratones portadores de tumor ($p=0.27$). Estos resultados difieren de otros obtenidos previamente en el laboratorio, descritos en un resumen, donde se observó una concentración significativamente menor de IFN-gamma en el grupo de ratones portadores de tumor bajo condiciones de estrés crónico que con respecto a los de reposo (Nájera-Valderrábano et al. 2014).

Por lo tanto, sí hubo una respuesta del sistema inmune frente al tumor inoculado, tal y como lo demuestra la elevación en la producción de IFN-gamma a nivel sistémico, dándose una respuesta de tipo Th1. Sin embargo, el paradigma de estrés utilizado no generó cambios significativos, sin que haya habido una disminución de IFN-gamma bajo condiciones de estrés crónico, como se esperaba.

Otro factor a tener en cuenta, son los ciclos circadianos de las citocinas (Nakao 2014; Keller et al. 2009), ya que no todas las muestras se pudieron tomar en el mismo horario, debido al número de ratones del estudio y se podrían haber generado ciertas diferencias dependiendo del horario en que se tomó la sangre de los ratones. Por ello, esto es una variable a tener en cuenta para próximos experimentos.

En cuanto a los datos de IL-6 plasmática (Figura 12e), no se detectó en el plasma de los grupos control (estrés ni reposo), dando valores de 0 pg/mL, y contando con un límite de detección de 1.4 pg/mL, según se indicó en el kit de citometría de flujo empleado.

En los grupos portadores de linfoma se observó una concentración de 29.3 \pm 10.0 pg/mL en los ratones estresados, y de 12.8 \pm 6.0 pg/mL en el caso de los ratones que permanecieron en las condiciones normales. Se dio una mayor producción media de IL-6 plasmática en los ratones estresados, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0.19$). Se esperaba que en presencia del estrés crónico hubiera una mayor producción de IL-6, teniendo en cuenta la función proangiogénica y la relación de esta citocina con el sistema del estrés, pero con el número de muestras analizadas no puede determinarse que haya diferencias significativas.

7.5.2 Cuantificación de citocinas intratumorales por citometría de flujo

Además de determinar la producción plasmática de citocinas, se realizó una extracción de proteínas del tejido tumoral (Figura 13) en condiciones de reposo ($n=3$) y bajo estrés crónico ($n=3$) y se analizó por citometría de flujo la presencia de citocinas Th1, Th2 y Th17, utilizando las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo una cuantificación de proteínas y se analizaron 20 μ g de proteína/muestra, mostrándose los resultados obtenidos en la Figura 13.

En general, se detectaron niveles bajos de citocinas en las muestras analizadas, dándose concentraciones de IL-2 (Figura 13a) de 6.06 \pm 0.13 pg/mL en reposo y 6.82 \pm 0.21 pg/mL bajo estrés crónico, con un valor de $p=0.04$ en la t de Student. Con respecto a IL-4 (Figura 13b), no se observaron diferencias significativas ($p=0.25$), observándose concentraciones de IL-4 de 4.7 \pm 0.5 pg/mL en reposo y 5.4 \pm 0.3 pg/mL en estrés crónico. En cuanto a IL-17 (Figura 13c), se detectó en ambos grupos pero a muy baja concentración: 0.22 \pm 0.03 pg/mL en reposo y 0.27 \pm 0.18 pg/mL en condiciones de estrés crónico, estando bajo los límites de detección indicados en el kit, por lo que no pueden ser tomados en cuenta.

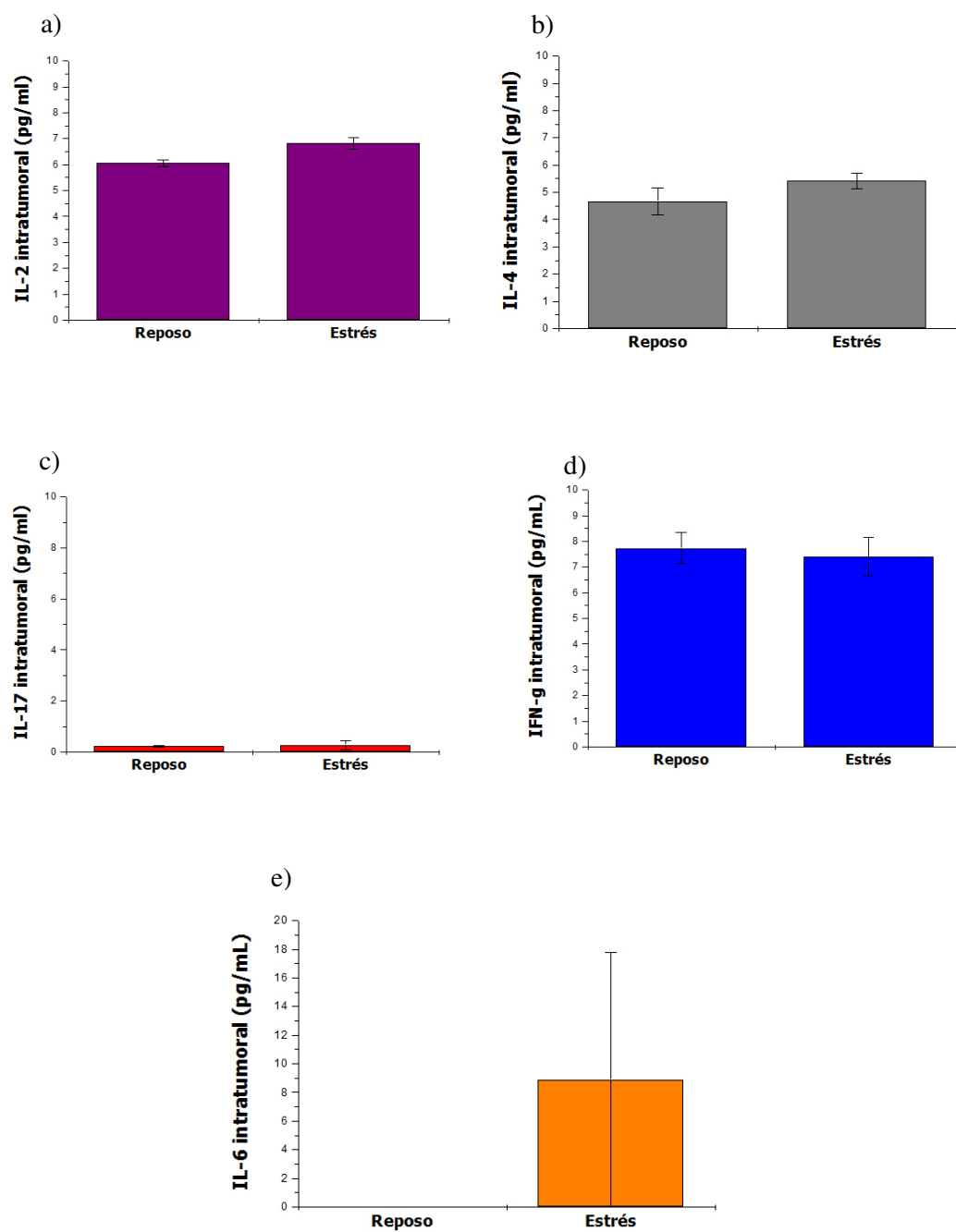


Figura 13. Cuantificación de citocinas Th1, Th2 y Th17 en extractos de proteínas de muestras tumorales de ratones Balb/c bajo estrés crónico y reposo.

Además, se detectaron concentraciones similares de IFN-gamma (Figura 13d) en ambas condiciones experimentales, no habiendo una diferencia significativa ($p=0.75$). Se dieron valores medios de 7.74 ± 0.6 pg/mL en reposo y 7.4 ± 0.75 pg/mL bajo estrés crónico. Por tanto, hubo una respuesta Th1 en presencia de tumor, por medio de IFN-gamma. Finalmente, con respecto a IL-6 (Figura 13e), únicamente se detectó en una muestra de tumor bajo estrés crónico, obteniéndose 0 pg/mL en las demás muestras, no habiendo por tanto, diferencias significativas ($p=0.37$) entre ambos grupos de interés.

7.6 Expresión génica de los genes *VEGF*, *HIF-1 α* , *VEGF-R2* e *IL-6* por PCR punto final

Con el objetivo de observar posibles diferencias en la expresión génica de los genes de interés: *VEGF*, *HIF-1 α* , *VEGF-R2* e *IL-6*, bajo las condiciones de estrés crónico y reposo, se estudió la expresión de estos genes en muestras de tumor por PCR punto final.

Inicialmente, se tenía planteado la utilización de PCR tiempo real para analizar con una técnica de mayor sensibilidad estos posibles cambios de expresión, sin embargo, surgieron problemas en cuanto a la funcionalidad del equipo de PCR tiempo real que se estaba utilizando así como en la eficiencia de algunos de los primers empleados, por lo que se decidió realizar los experimentos por PCR punto final.

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando 30 ciclos de PCR y 100 ng de cDNA. Los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio se visualizaron utilizando un transiluminador y se tomaron fotografías. Éstas se analizaron utilizando el software ImageJ para llevar a cabo un análisis de densitometría. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14.

Se analizaron 5 muestras de linfomas de ratones que permanecieron en las condiciones normales de alojamiento y 5 muestras de ratones sometidos a estrés crónico para los distintos genes (Figura 14). Utilizando el programa ImageJ, se calcularon las áreas correspondientes a cada muestra, así como el porcentaje que representan y se llevó cabo la normalización de los datos. Posteriormente, se calcularon las razones o ratio correspondientes a cada gen de interés (estrés crónico y reposo) sobre los datos obtenidos para el control endógeno, el gen β -actina.

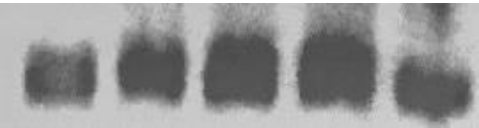
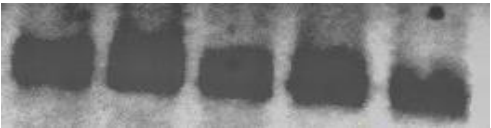
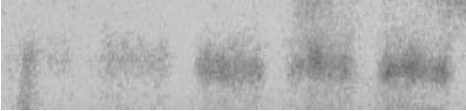





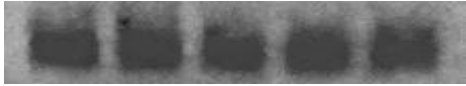
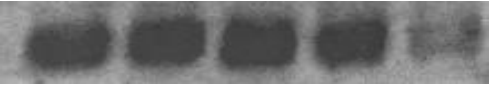
Gen	Condiciones de reposo	Estrés crónico
β -actina		
VEGF		
VEGF-R2		
HIF-1		
IL-6		

Figura 14. Se muestran las imágenes correspondientes a los geles de agarosa tras la electroforesis de las muestras de PCR punto final (para los genes *VEGF*, *HIF-1 α* , *VEGF-R2*, *IL-6* y β -Actina) y tras el análisis de densitometría correspondiente con el software libre ImageJ.

Por último, se calculó un nuevo ratio tomando los valores obtenidos de las muestras bajo estrés crónico de los genes *VEGF*, *HIF-1 α* , *VEGF-R2* e *IL-6*, y dividiéndolos sobre el valor medio del grupo de muestras que correspondieron a reposo.

Los resultados obtenidos (Figura 15) se sometieron a una prueba de ANOVA de una vía y se obtuvo un valor de $p < 0.05$ ($p = 0.023$), por lo que hubo diferencias significativas entre los grupos. Posteriormente, se determinó por la prueba de Tukey, que el grupo que presentó diferencias significativas fue el correspondiente a *VEGF-R2*, el cual presentó un ratio de 1.38 ± 0.09 , en comparación con el control esperado (valor=1) en el caso de que no hubiera diferencias entre las condiciones de estrés crónico y reposo.

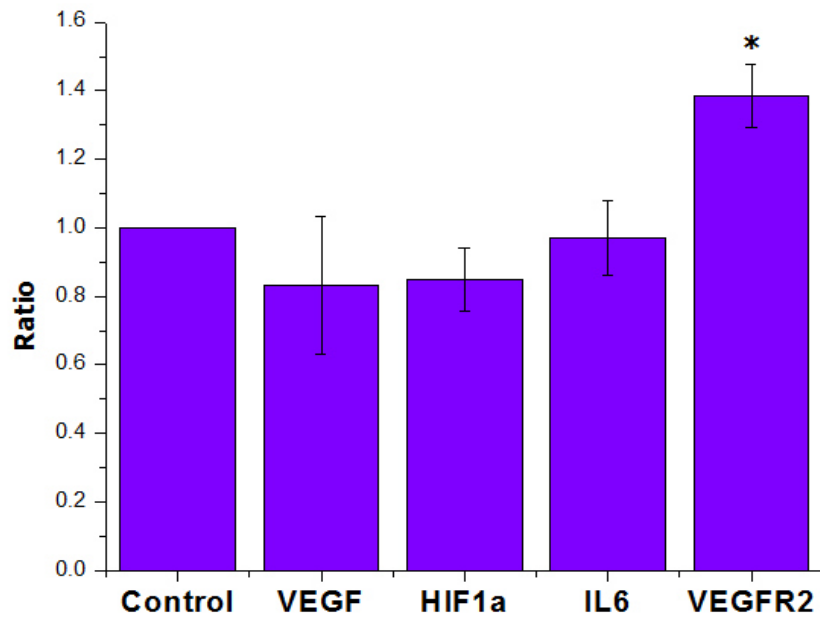


Figura 15. Representación del análisis final de los datos obtenidos por densitometría, donde se representan los diferentes ratios obtenidos para los genes *VEGF*, *HIF-1 α* , *VEGF-R2* e *IL-6*, en comparación con el control estadístico (valor=1), observándose diferencia significativa en la expresión de *VEGF-R2* ($p = 0.0032$).

Para calcular el ratio, se tomaron los valores de estrés crónico sobre el valor medio de las muestras de reposo, por lo que un incremento en el ratio quiere decir que hubo una mayor expresión génica de *VEGF-R2* bajo condiciones de estrés crónico que con respecto al control.

La expresión del resto de los genes de interés: *VEGF*, *HIF-1 α* e *IL-6*, no sufrió cambios significativos bajo condiciones de estrés crónico, al menos al nivel de sensibilidad que aporta la técnica de PCR punto final.

Existen diversos antecedentes (Thaker et al. 2006; Shan et al. 2013) donde se muestra cómo mediante la utilización de paradigmas de estrés crónico se da una mayor expresión de *VEGF*, el cual es el principal factor angiogénico, en tumor, así como de *HIF-1*, que es el principal factor transcripcional activador del gen *VEGF*. Además, también se ha reportado un incremento de *IL-6* en condiciones de estrés crónico, lo cual es importante por las múltiples funciones que lleva a cabo, entre ellas, como pro-angiogénica. Sin embargo, utilizando el paradigma de estrés por restricción de movimiento (30 minutos de duración) y nado forzado durante 24 días, no se consiguió observar diferencias significativas en los parámetros anteriormente mencionados.

Esto puede deberse a que el protocolo utilizado no es lo suficientemente agresivo como para generar cambios importantes a nivel de expresión génica, ya que generalmente se utilizando protocolos de mayor duración (2-6 horas diarias) y la aplicación de 30 minutos (o 15 minutos en caso de nado forzado) no fue suficiente.

Únicamente se observó diferencia significativa en cuanto a la expresión del gen que codifica para el principal receptor de VEGF: *VEGF-R2*. Anteriormente, se observó que *IL-6* induce la expresión de *VEGF-R2* en células epiteliales intestinales en colitis asociada a cáncer (CAC) y que está implicado el factor de transcripción *STAT3*, que es activado por *IL-6* entre otras proteínas (Waldner et al. 2010).

7.7 Análisis histológico del linfoma L51Y8YR bajo condiciones de estrés crónico y de reposo

Tras la finalización del protocolo de estrés crónico se llevó a cabo la extracción de los tumores formados en la extremidad posterior derecha de los ratones. Parte de las muestras obtenidas se incluyeron en una solución de formalina 10 % para realizar la fijación de los tejidos y posteriormente, realizar la inclusión de éstos en parafina, así como los cortes por medio de un micrótopo y la posterior tinción diferencial con hematoxilina y eosina.

Para llevar a cabo el análisis de las muestras y la descripción histopatológica de éstas, se contó con la colaboración del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León. A continuación se presentan las descripciones de las muestras histológicas así como algunas fotografías de las características principales.

7.7.1 Muestras de tumor en reposo

1. Muestra 4 Tumor Reposo:

Se observó una gran proliferación de tejido conectivo y edema intersticial, así como anisocariosis y anisocitosis (núcleos y citoplasmas de distintos tamaños, respectivamente), siendo esto indicativo de indiferenciación celular. Se observó un número alto de mitosis atípicas (6-7 mitosis/campo). No se encontró infiltración de las células tumorales en los vasos sanguíneos y se pudieron observar focos hemorrágicos.

Además de esto, se detectó necrosis tisular en amplias zonas, principalmente en la región interna, viéndose áreas de tinción rosada en lugar de la tinción típica de las células de linfoma. Se muestran algunas imágenes en la Figura 16.

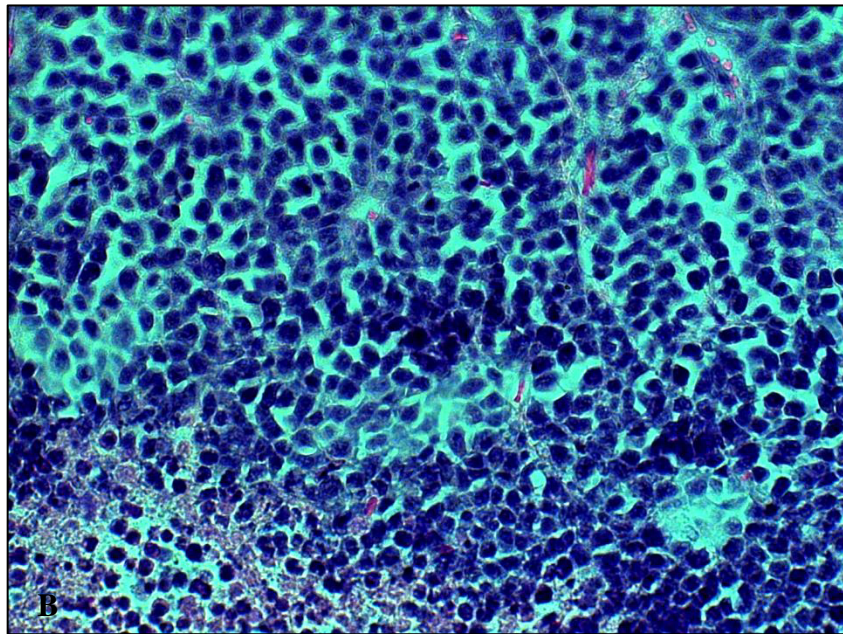
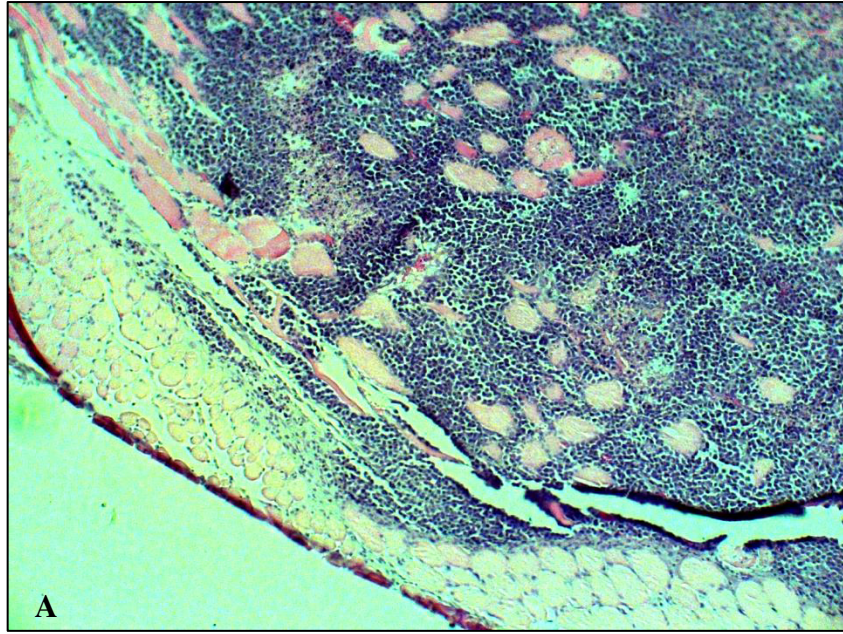


Figura 16. a) Infiltración tumoral entre las fibras musculares de la extremidad posterior derecha (10X). b) Anisocariosis y anisocitosis en las células del linfoma (40X). c) Se muestran focos hemorrágicos (40X). d) Se pueden observar importantes regiones de necrosis tisular (20X).

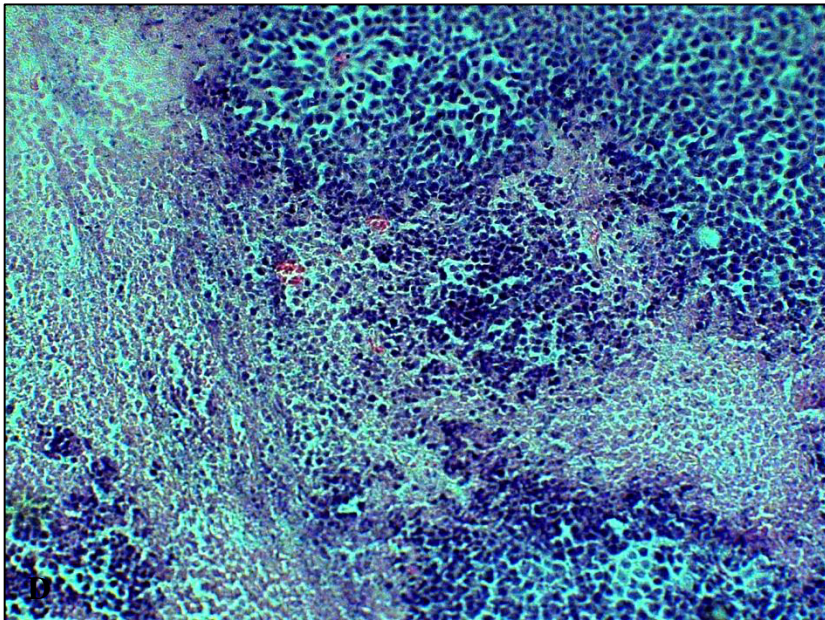
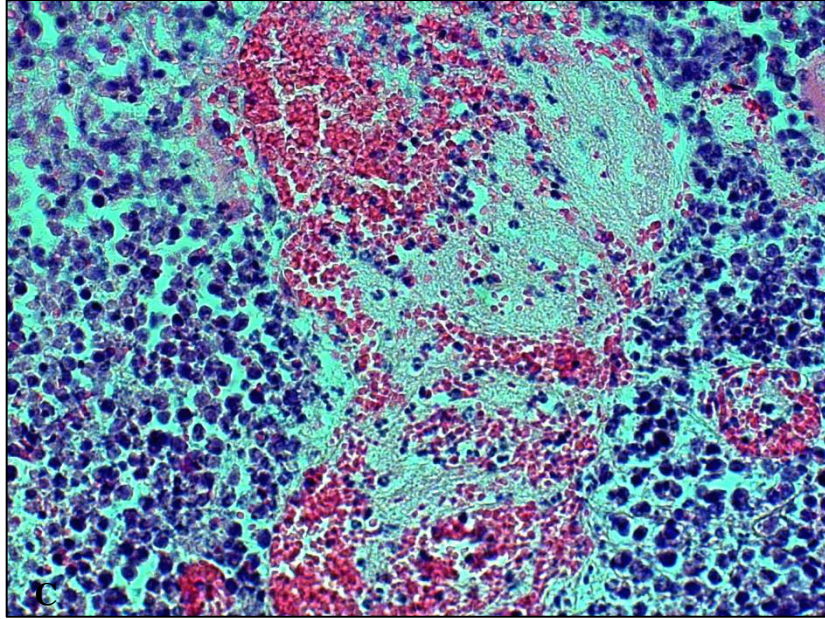


Figura 16. a) Infiltración tumoral entre las fibras musculares de la extremidad posterior derecha (10X) b) Anisocariosis y anisocitosis en las células del linfoma (40X). c) Se muestran focos hemorrágicos (40X). d) Se pueden observar importantes regiones de necrosis tisular (20X).

2. Muestra 8 Tumor Reposo:

Se observó que las células tumorales se infiltraron en el tejido conectivo y entre las fibras musculares, provocando lo que se denomina edema interfascicular de las fibras musculares. Además, se observó anisocariosis y un índice alto de mitosis atípicas (4-6 mitosis atípicas por campo).

Los vasos sanguíneos observados no están invadidos por las células tumorales, dándose pequeñas hemorragias, es decir, que hubo daño vascular. Además, no se llegaron a observar células infiltradas del sistema inmune. Principalmente en la parte interna se observaron regiones de necrosis tisular. Se muestran algunos ejemplos en la Figura 17.

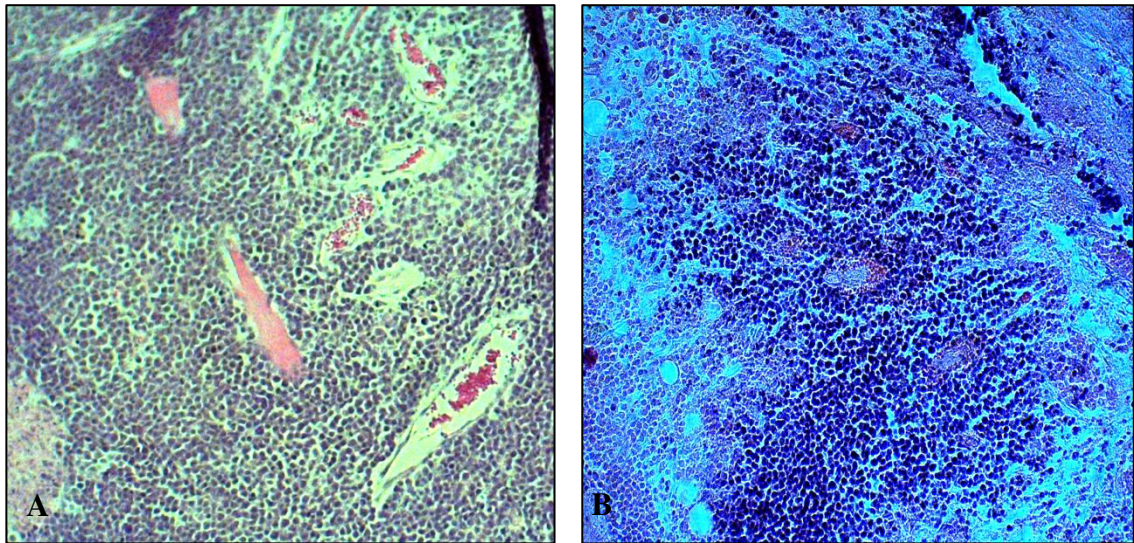


Figura 17. a) Se muestran vasos sanguíneos sin infiltración de células tumorales (20X). b) Regiones de necrosis tisular, así como anisocitosis y anisocariosis (20X). c) Se observa que las células tumorales llegaron hasta el cartílago, y se muestran calcificaciones (40X). d) Proliferación del linfoma entre las fibras musculares (40X).

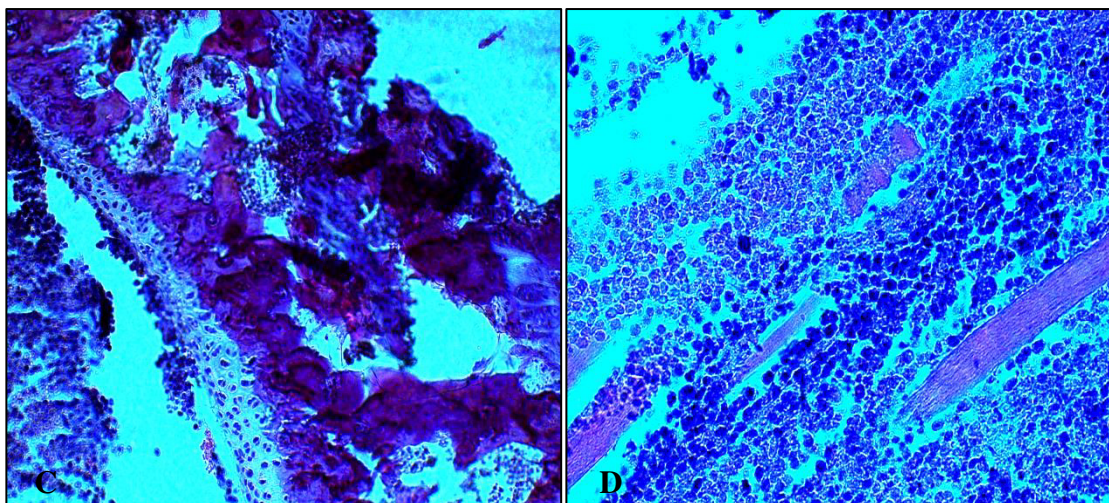


Figura 17. a) Se muestran vasos sanguíneos sin infiltración de células tumorales (20X). b) Regiones de necrosis tisular, así como anisocitosis y anisocariosis (20X). c) Se observa que las células tumorales llegaron hasta el cartílago, y se muestran calcificaciones (40X). d) Proliferación del linfoma entre las fibras musculares (40X).

3. *Muestra 9 Tumor Reposo:*

Las células tumorales proliferaron entre las fibras musculares y en el tejido conectivo como se mostró anteriormente. De nuevo, se observaron amplias regiones necróticas (lo cual posiblemente causó dolor a los animales). En este caso, se observaron un índice de mitosis atípicas de 3-4 mitosis/campo, siendo algo menor que en las muestras anteriores (Figura 18).

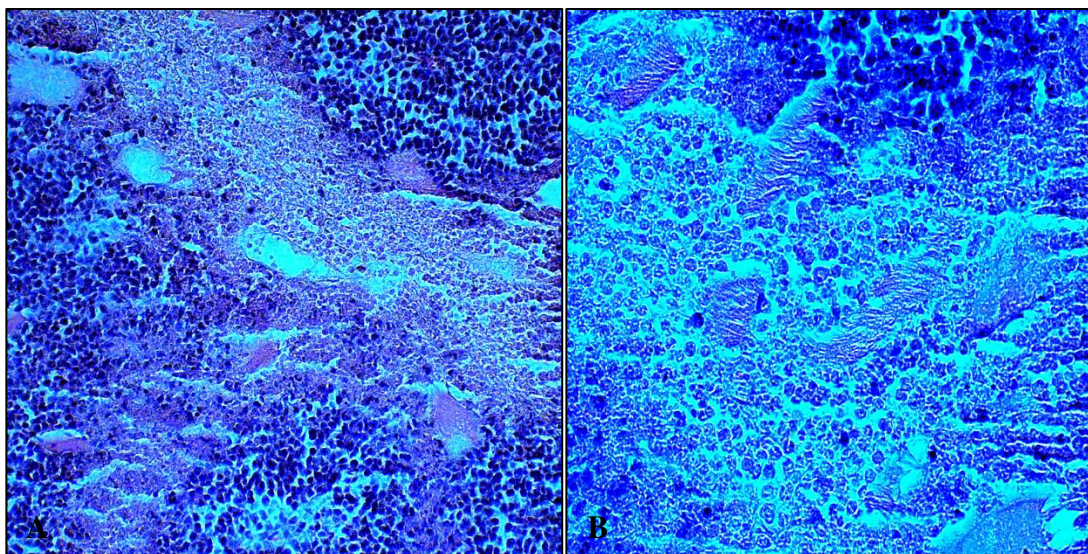


Figura 18. a, b) Áreas de necrosis tisular (20X y 40X, respectivamente en a y b).

7.7.2 Muestras de tumor bajo estrés crónico

1. *Muestra 2 Tumor Estrés:*

Se pudo observar una gran proliferación del tejido conectivo así como edema intersticial, dándose necrosis tisular avanzada en la región interna (gran destrucción celular) y con focos de hemorragias. Se determinó un índice mitótico alto (6-8 mitosis atípicas por campo). También fue posible observar algunas células infiltradas del sistema inmune entre las células tumorales (Figura 19).

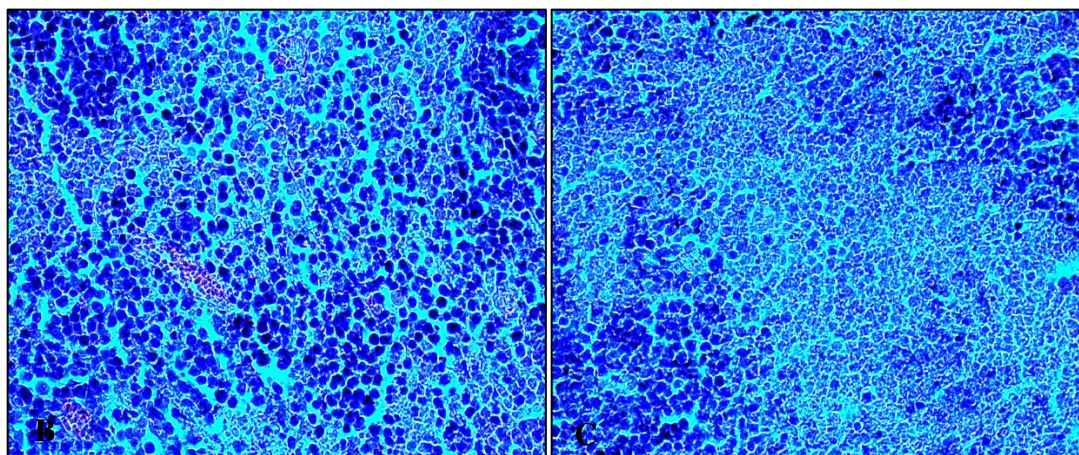
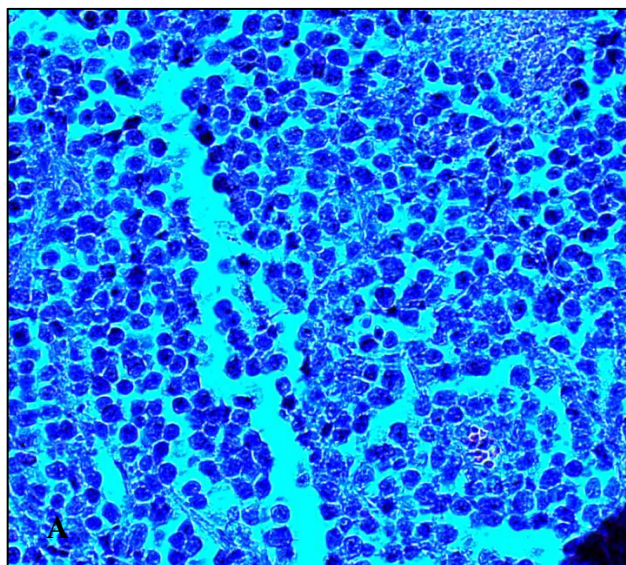


Figura 19. a) Células tumorales del linfoma L5178Y-R así como algunos infiltrados del sistema inmune (40X). b) Presencia de pequeñas hemorragias. c) Regiones de necrosis tisular en linfoma murino bajo estrés crónico.

2. *Muestra 3 Tumor Estrés:*

En esta muestra fue posible observar calcificaciones (como consecuencia de que la necrosis genera un cambio en el pH, provocando que las sales precipiten y formen estas estructuras) y necrosis cartilaginosa, así como regiones importantes de muerte tisular. Se observó un potencial mitótico muy alto (7-8 mitosis/campo) y ciertos focos hemorrágicos (Figura 20).

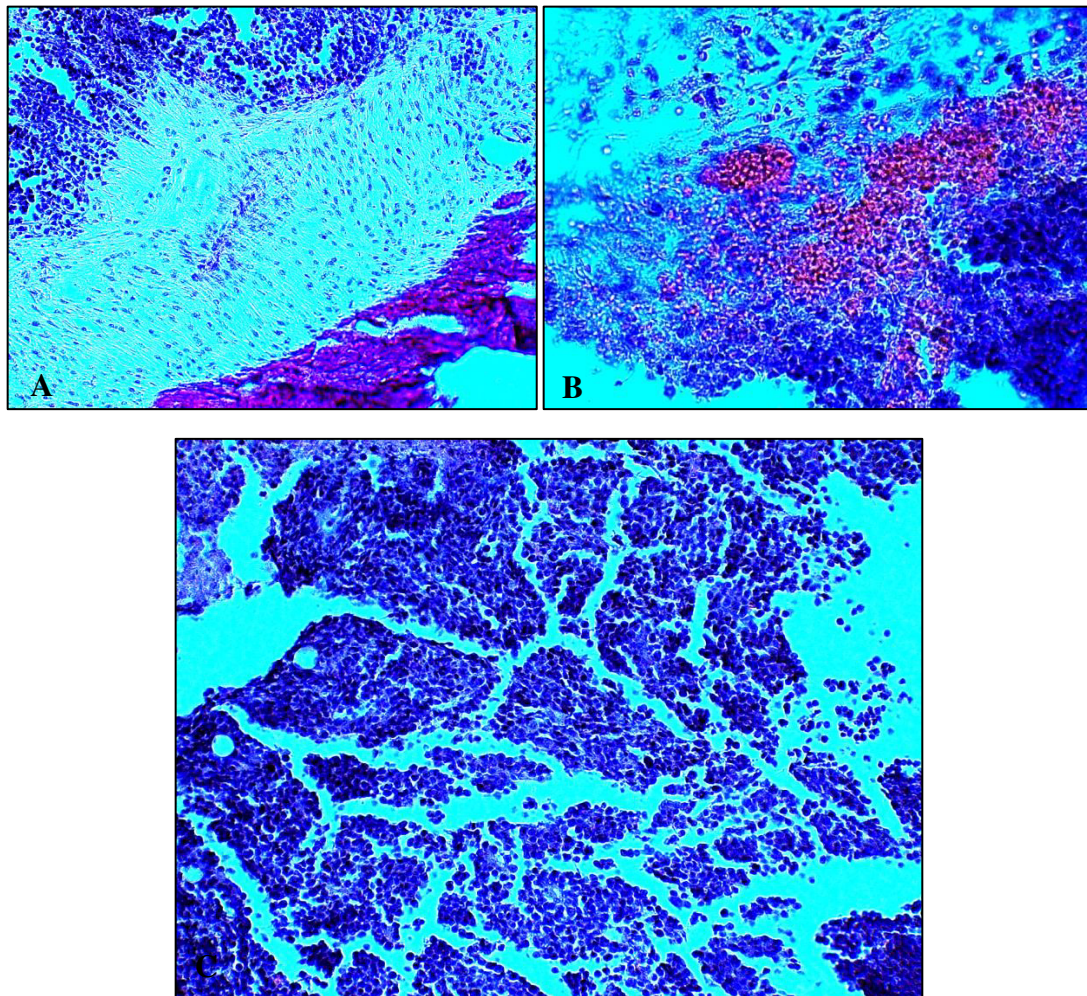


Figura 20. a) Células tumorales (linfoblastos) junto al tejido cartilaginoso. b) Focos hemorrágicos en el linfoma L5178Y-R. c) Se muestran las células tumorales con distintos tamaños de núcleos y citoplasmas.

3. *Muestra 4 Tumor Estrés:*

Al igual que en las muestras descritas anteriormente, se observaron regiones extensas de necrosis (gran destrucción celular con la cromatina ya dispersa), ciertas hemorragias y destrucción del cartílago. También se pudo observar un índice de mitosis atípicas alto (7 mitosis/campo). No hubo en ningún caso invasión de los vasos sanguíneos por las células tumorales (Figura 21).

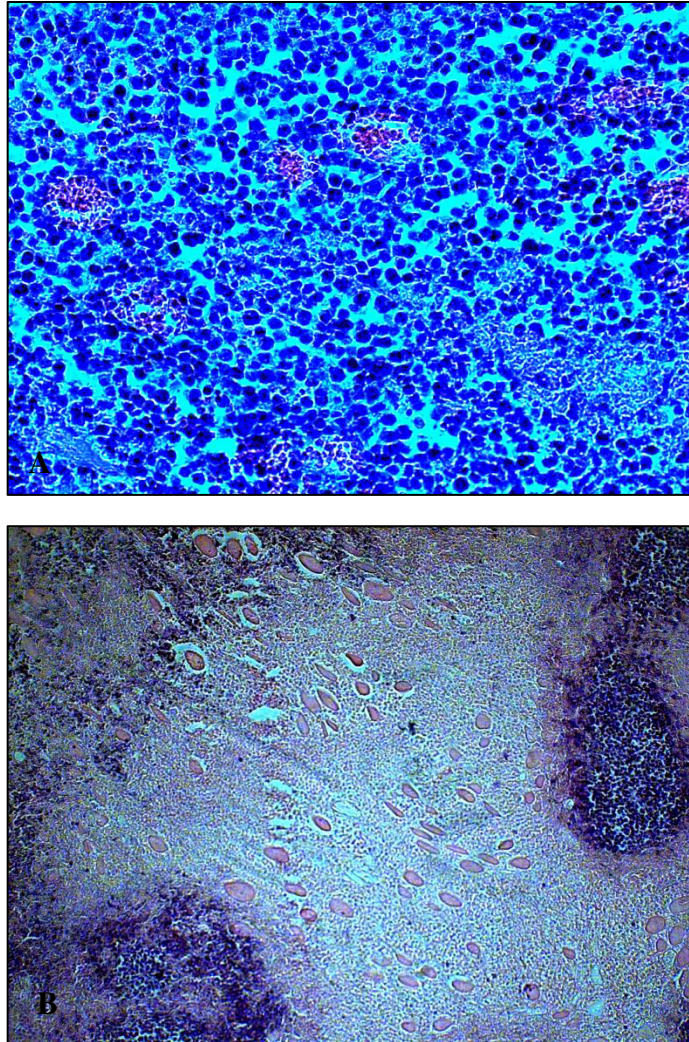


Figura 21. a) Vasos sanguíneos entre las células tumorales, en animales bajo estrés crónico (40X). b) Amplias regiones de necrosis tisular, con infiltración muscular del tumor (10X).

7.7.3 Clasificación semicuantitativa de características histológicas del tumor

Se realizó una recopilación de las características observadas en los cortes histológicos, de forma semicuantitativa, siguiendo la siguiente escala: Discreto: +, Moderado: ++, Severo: +++, - ausente. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

MUESTRA	Infiltración muscular	Mitosis atípicas	Muerte celular	Infiltración vascular	Hemorragia
4TR	++	+++	++	-	+
8TR	+	++	++	-	+
9TR	++	+	+	-	-
2TE	++	+++	++	-	+
3TE	++	++	+	-	+
4TE	++	+++	++	-	+

Tabla 3. Clasificación semicuantitativa de características histológicas presentes en el linfoma murino.

En general, se pudieron observar características similares en ambos grupos: reposo y estrés crónico; dándose en ambos regiones de necrosis, infiltración de las fibras musculares por parte de las células tumorales, ausencia de infiltración en los vasos sanguíneos y alta tasa de mitosis atípicas, así como la infiltración de algunas células del sistema inmunitario entre el tejido tumoral. El análisis realizado no permite determinar diferencias significativas a nivel histológico entre ambos grupos experimentales.

8. DISCUSIÓN

Los efectos del estrés crónico sobre el organismo son múltiples y complejos, afectando a los distintos sistemas y favoreciendo la presencia o progresión de diferentes enfermedades. En los últimos años, se han empleado paradigmas de inducción de estrés agudo y crónico en animales de experimentación, principalmente en roedores, con el objetivo de conocer mejor estos efectos.

Uno de los principales indicadores de los efectos del estrés crónico es la pérdida o no ganancia de peso corporal, debido a que bajo condiciones de estrés tienen lugar modificaciones a nivel metabólico como consecuencia de la acción de las hormonas liberadas, como son la corticosterona y norepinefrina. En cuanto a la evolución del peso corporal, se observó una menor ganancia de peso en ratones a los que se indujo el estrés crónico, tanto en el grupo control como en el portador de tumor. Además, no hubo diferencias significativas en el peso de los ratones que permanecieron en condiciones de reposo independientemente de que se les inoculara el tumor o no, por lo que la presencia del tumor no generó una pérdida de peso en los animales. Otro indicador complementario es el índice de masa corporal (IMC), observándose menor IMC en los grupos bajo estrés crónico que en los de reposo. Por tanto, el paradigma de estrés empleado tuvo un efecto sobre el peso corporal siendo esto una evidencia de la inducción de estrés crónico en los ratones. También se quiso evaluar el estado anímico empleando la prueba de preferencia por sacarosa, que suele usarse en modelos de depresión. Sin embargo, no se observó un estado de anhedonia o depresión en los ratones bajo estrés crónico, pudiendo deberse a que el estrés inducido no es lo suficientemente agresivo como para generar depresión. Además, hay antecedentes que muestran que es la anhedonia (y no el estrés crónico) la que se asocia con síntomas de la depresión, como son un mayor tiempo de flotación durante el nado forzado y menor exploración, es decir, que el estrés crónico no siempre está asociado con estado de anhedonia. Por otro lado, se ha visto previamente que una mayor ansiedad y pérdida de peso corporal fueron consecuencias del estrés crónico, independientemente de la anhedonia (Strekalova 2004).

Uno de los principales efectos del estrés crónico en cuanto al cáncer, es favorecer la progresión de éste, siendo la angiogénesis una de las vías más importantes. Para estudiar el efecto del paradigma empleado sobre la progresión del linfoma, se evaluó la progresión del volumen tumoral, y se observó una progresión más rápida (en los días 12 y 15) en el grupo bajo estrés crónico, pero sin darse un mayor volumen y peso tumoral final. El hecho de que no hubiera diferencias significativas al final del protocolo podría deberse a que el periodo diario de inducción de estrés crónico no fue suficiente como para generar un mayor crecimiento tumoral. Además de esto, debido a la localización del tumor, en una extremidad, esto supone una limitación en cuanto al tamaño máximo que puede alcanzar el tumor, sin que se comprometa la movilidad y bienestar de los ratones. A su vez, el análisis histológico realizado tampoco permitió determinar diferencias significativas entre ambos grupos experimentales.

En cuanto a los niveles plasmáticos de las hormonas del estrés, se midieron con la intención de comprobar si se estaba dando la activación o no del sistema del estrés como consecuencia del paradigma utilizado. Con respecto a los resultados de corticosterona, no se observó una diferencia significativa ($p>0.05$) entre los grupos controles (sin tumor), estrés crónico y reposo. Esto puede deberse a que hubo una regulación negativa del eje HPA tras los 24 días de protocolo, es decir, que la inducción del estrés crónico no fue suficiente como mantener elevados los niveles de corticosterona tras un protocolo de 24 días. Para llevar a cabo la elección del tipo de paradigma de estrés, nos basamos en antecedentes como, Zamora et al. 2013, donde reportaron un nivel elevado de corticosterona en el grupo de ratones estresados con respecto al grupo control, indicando que esto puede deberse a un fallo en el mecanismo feedback negativo del eje HPA. Sin embargo, en nuestro experimento no se observó esto, además de que los niveles de corticosterona observados fueron menores (no superaron los 50 ng/mL), ya que reportan valores de entre 85-145 ng/mL (Zamora et al. 2013). Otro factor a tener en cuenta, es el ciclo circadiano de la corticosterona (Chung et al. 2011), ya que la hora del día en la que se lleva a cabo el sacrificio y la toma de muestras, podría afectar en los resultados finales, debido las variaciones diarias en la concentración de esta hormona.

En cambio, sí se determinó una producción significativamente mayor de corticosterona en ratones portadores de tumor bajo estrés, que con respecto a los de reposo. El hecho de que sí hubiera una mayor activación del eje HPA en forma de producción plasmática de corticosterona en condiciones de presencia de tumor en el organismo, pero no en ratones sanos (ausencia de tumor), puede deberse a que el propio tumor, por su presencia en el organismo, esté generando esta respuesta.

Además, otra variable que es necesario tomar en consideración es que el nivel de corticosterona en las hembras puede fluctuar según el punto del ciclo estral en el que se encuentren (Malisch et al. 2007), por lo que sería importante regular esta variable en próximos experimentos, así como realizar estos estudios en ratones machos, para evitar estas posibles influencias hormonales y determinar posibles variaciones debidas al sexo de los animales.

Otra de las principales hormonas liberadas en respuesta a estrés es la norepinefrina. Se observaron diferencias significativas entre los grupos controles y los grupos portadores de tumor dándose una concentración de NE en plasma 7-8 veces mayor en los grupos con tumor que en los animales sanos ($p < 0.05$). Existen antecedentes de protocolos de restricción del movimiento y nado forzado en los que se reportó una diferencia significativa en los niveles de NE a los 14 días, pero no tras los 21 o 28 días, como es nuestro caso, pudiendo esto deberse a un bucle de regulación hormonal en la que participa la corticosterona (Zamora et al. 2013). Esto parece indicar, que la diferencia en el nivel de NE plasmática, no se debió tanto a la inducción o no del estrés crónico como a la presencia de un tumor en el organismo, ya que éste es una forma de estrés en sí mismo, pudiendo estimular la producción de hormonas del estrés en el microambiente tumoral (Jobling et al. 2015).

Otro aspecto importante, fue determinar posibles cambios en la producción plasmática de citocinas entre las dos variables de interés: estrés crónico y reposo. Únicamente se observaron diferencias significativas en cuanto a la producción de IFN-gamma e IL-6, entre los ratones portadores de tumor y los ratones sin tumor, sin que hubiera diferencia entre estrés crónico y reposo. Por lo tanto, sí hubo una respuesta del sistema inmune frente al tumor inoculado, tal y como lo demuestra la elevación en la

producción de IFN-gamma a nivel sistémico, dándose una respuesta de tipo Th1. Sin embargo, el paradigma de estrés utilizado no generó cambios significativos, sin que haya habido una disminución de IFN-gamma bajo condiciones de estrés crónico, como ha sido reportado anteriormente (Vieira et al. 1998; Curtin et al. 2009). Además, tampoco se observó un cambio de respuesta Th1 a Th2, ya que no se dieron diferencias significativas en la producción de IL-2 o IL-4.

En cuanto a los datos de IL-6 plasmática, no se detectó en el plasma de los grupos control (estrés ni reposo), mientras que en los ratones portadores de tumor no hubo diferencia significativa entre los grupos de estrés crónico y reposo, aunque sí pudo observarse una cierta tendencia a una mayor producción en presencia de estrés crónico. Se esperaba que en presencia del estrés crónico hubiera una mayor producción de IL-6, teniendo en cuenta la función proangiogénica y la relación de esta citocina con el sistema del estrés (Rohleder et al. 2012; Yang et al. 2014), pero con el número de muestras analizadas no puede determinarse que haya diferencias significativas.

Otro factor a tener en cuenta, son los ciclos circadianos de las citocinas (Nakao 2014; Keller et al. 2009), ya que no todas las muestras se pudieron tomar en el mismo horario, debido al número de ratones del estudio y se podrían haber generado ciertas diferencias dependiendo del horario en que se tomó la sangre de los ratones. Por ello, esto es una variable a tener en cuenta para próximos experimentos.

Existen diversos antecedentes (Thaker et al. 2006; Shan et al. 2013) donde se muestra cómo mediante la utilización de paradigmas de estrés crónico se da una mayor expresión de *VEGF*, el cual es el principal factor angiogénico, en tumor, así como de *HIF-1*, que es el principal factor transcripcional activador del gen *VEGF*. Además, también se ha reportado un incremento de IL-6 en condiciones de estrés crónico, lo cual es importante por las múltiples funciones que lleva a cabo, entre ellas, como proangiogénica. Sin embargo, utilizando el paradigma de estrés por restricción de movimiento (30 minutos de duración diaria) y nado forzado durante 24 días, no se consiguió observar diferencias significativas en los parámetros anteriormente mencionados, probablemente porque el protocolo utilizado no es lo suficientemente agresivo como para generar cambios importantes a nivel de expresión génica.

Únicamente se observó diferencia significativa en cuanto a la expresión del gen que codifica para el principal receptor de VEGF: *VEGF-R2*, dándose una mayor expresión del gen *VEGFR2* bajo condiciones de inducción de estrés crónico en comparación con condiciones de reposo. Anteriormente, se reportó que IL-6 induce la expresión de *VEGF-R2* en células epiteliales intestinales en colitis asociada a cáncer (CAC) y que en este proceso está implicado el factor de transcripción STAT3, el cual es activado por IL-6 entre otras proteínas (Waldner et al. 2010).

9. CONCLUSIONES

1. En presencia de estrés crónico, hay una disminución del índice de masa corporal y menor ganancia de peso corporal.
2. El estrés crónico inducido a los ratones ocasiona una progresión más rápida del tumor (días 12 y 15 del protocolo) pero no un mayor tamaño tumoral final.
3. Únicamente en presencia del tumor, se observaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de las hormonas del estrés y ciertas citocinas, por lo que el protocolo utilizado no parece ser suficiente para inducir cambios importantes a nivel sistémico.
4. Se observó una mayor expresión de *VEGF-R2* en tumores bajo estrés crónico. El análisis histológico efectuado no reveló diferencias significativas entre tumores de ratones en reposo y bajo estrés crónico.

10. PERSPECTIVAS

1. Continuar estudiando el modelo murino de linfoma para una mejor comprensión de éste y emplear modelos de estrés con mayor duración (2-4 horas diarias).
2. Estudiar los efectos del estrés a distintos tiempos (no solamente al final del protocolo) para evaluar la evolución de los distintos parámetros (hormonas, citocinas y expresión génica).
3. Estudiar el efecto del estrés en ratones machos Balb/c, para descartar el efecto de variaciones hormonales propios de las hembras.

11. BIBLIOGRAFÍA

Achen MG, Stacker SA. 1998. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *International Journal of Experimental Pathology* 79: 255–265.

Adams J, Carder PJ, Downey S, Forbes MA, MacLennan K, Allgar V, Kaufman S, Hallam S, Bicknell R, Walker JJ, et al. 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in breast cancer: comparison of plasma, serum and tissue VEGF and microvessel density and effects of tamoxifen. *Cancer Research* 60:2898–2905.

Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, and Gabrilovich DI. 2000. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clinical Cancer Research* 6:1755–1766.

Anglesio MS, George J, Kulbe H, et al. 2011. IL6-STAT3-HIF Signaling and Therapeutic Response to the Angiogenesis Inhibitor Sunitinib in Ovarian Clear Cell Cancer. *Clinical Cancer Research* 17: 2538-2548.

Armaiz-Pena GN, Lutgendorf SK, Cole SW, Sood AK. 2009. Neuroendocrine modulation of cancer progression. *Brain Behaviour and Immunology*. 23:10–15.

Beatty GL, Paterson Y 2001. Regulation of tumor growth by IFN-gamma in cancer immunotherapy. *Immunology Research* 24:201-210.

Brocato J, Chervona Y, Costa M. 2014. Molecular Responses to Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Beyond. *Molecular Pharmacology* 85:651–657.

Cao D, Hou M, Guan YS, Jiang M, Yang Y, and Gou HF. 2009. Expression of HIF-1 α and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC Cancer* 9:432-442.

Carbia-Nagashima, Gerez J, Perez-Castro C. 2007. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 α during hypoxia. *Cell* 131:309–323.

Carmeliet P and Jain RK. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature (Lond)* 407:249–257.

Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, et al. 1998. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature (Lond)* 394:485–490.

Casulo C, Arcila M, Bohn OL, Teruya-Feldstein J, Maragulia J, Moskowitz CH. 2013. Tumor associated macrophages in relapsed and refractory Hodgkin lymphoma. *Leukemia Research* 37:1178-1183.

Chai DM, Bao ZQ, Hu JG, Ma L, Feng ZZ, and Tao YS. 2013. Vasculogenic mimicry and aberrant expression of HIF-1 α /E-cad are associated with worse prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Huazhong University of Science and Technology* 33:385–391.

Chiba S, et al. 2012. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 39: 112-119.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.

Chourbaji S, Urani A, Inta I, Sanchis-Segura C, Brandwein C, Zink M, Schwaninger M, Gass P. 2006. IL-6 knockout mice exhibit resistance to stress-induced development of depression-like behaviors. *Neurobiology of Disease* 23: 587-594.

Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, and Cantley LC. 2008. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452: 230–233.

Chrousos, G.P. 2009. Stress and Disorders of the Stress System. *Nature Review Endocrinology* 5: 374-381.

Chung S, Son GH, Kim K. 2011. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. *BBA Molecular Basis of Disease* 1812:581-591.

Cole SW, Sood AK. 2012. Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clinical Cancer Research* 18: 1201- 1206.

Curtin NM, Boyle NT, Mills K, Connor TJ. 2009. Psychological stress suppresses innate IFN-gamma production via glucocorticoid receptor activation: Reversal by the anxiolytic chlordiazepoxide. *Brain, Behavior, and Immunity* 23:535–547.

Dawson TM, Snyder SH. 1991. Epidemiology of heart failure. *Journal of Neuroscience* 14:5147-5149.

Diehl S, Rincón M. 2002. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular Immunology* 39:531-536.

Dragoş D, Tănăsescu MD. 2010. The effect of stress on the defense systems. *Journal of Medicine and Life* 3: 10-18.

Elvidge GP, Glenny L, Appelhoff RJ, Ratcliffe PJ, Ragoussis J, and Gleadle JM. 2006. Concordant regulation of gene expression by hypoxia and 2-oxoglutarate dependent dioxygenase inhibition: the role of HIF-1alpha, HIF-2alpha, and other pathways. *The Journal of Biological Chemistry* 281:15215–15226.

Fillies T, Werkmeister R, van Diest PJ, Brandt B, Joos U, and Buerger H. 2005. HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. *BMC Cancer* 5:84-86.

Flinn MV, et al.. 2011. Evolutionary functions of early social modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis development in humans. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35: 1611-1629.

Folkman J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine* 285: 1182–1186.

Gabrilovich DI, Ishida T, Nadaf S, Ohm JE, and Carbone DP. 1999. Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clinical Cancer Research* 5:2963–2970.

Girotti M, Donegan JJ, Morilak DA. 2011. Chronic intermittent cold stress sensitizes neuro-immune reactivity in the rat brain. *Psychoneuroendocrinology* 36:1164–1174.

Girotti M, Donegan JJ, Morilak DA. 2012. Influence of hypothalamic IL-6/gp130 receptor signaling on the HPA axis response to chronic stress. *Psychoneuroendocrinology*. 38: 1158–1169.

Glaser R, Rice J, Sheridan J, Fertel R, Stout J, Speicher C, Pinsky D, Kotur M, Post A, Beck M, Kiecolt-Glaser. 1987. Stress-related immune suppression: Health implications. *Brain, Behavior and Immunity*. 1:7-20.

Gomez-Flores R, et al. 2005. Increased survival of tumor-bearing mice by delta opioid SNC. *Anticancer Research* 25:4563-4567.

Guo C, Buranych A, Sarkar D, Fisher PB, Wang X. 2013. The role of tumor-associated macrophages in tumor vascularization. *Vascular Cell* 5:20.

Hall J, Witter AR, Racine RR, Berg RE, Podawiltz A, Jones H, Mummert ME. 2014. Chronic psychological stress suppresses contact hypersensitivity: Potential roles of dysregulated cell trafficking and decreased IFN- γ Production. *Brain, Behavior, and Immunity* 36:156–164.

Hein L, Altman JD, Kobilka BK. 1999. Two functionally distinct α_2 -adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission. *Nature* 402: 181-184.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom OT, De bruijn EA. 2004. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. *Pharmacological Reviews* 56:549–580.

Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. 2002. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Reviews* 13: 95–109.

Jankord R, Turk JR, Schadt JC, Casati J, Ganjam VK, Price EM, Keisler DH, Laughlin MH. 2007. Sex difference in link between interleukin-6 and stress. *Endocrinology* 148:3758–3764.

Jobling P, Pundavela J, Oliveira SM, Walker MM, Hondermarck H. 2015. Nerve-cancer cell cross-talk: A novel promoter of tumor progression. *Cancer Research*. 75:1777-1781.

Kaelin WG, Ratcliffe PJ. 2008. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell*. 30: 393-402.

Kaelin WG. 2005. Proline hydroxylation and gene expression. *Annual Review of Biochemistry* 1:115–128.

Kang SH, Yu MO, Park KJ, Chi SG, Park DH, Chung YG. 2010. Activated STAT3 regulates hypoxia-induced angiogenesis and cell migration in human glioblastoma. *Neurosurgery* 67:1386–1395.

Keller M, Mazuch J, Abraham U, Eorn GD, Herzog ED, Volk HD, Kramer A, Maier B. 2009. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106:21407-21412.

Kim DJ, Tremblay ML, Digiovanni J (2010). Protein tyrosine phosphatases, TC-PTP, SHP1, and SHP2, cooperate in rapid dephosphorylation of Stat3 in keratinocytes following UVB irradiation. *PLoS One* 5:e10290.

Kim KS, Han P. 2006. Optimization of chronic stress paradigms using anxiety- and depression-like behavioral parameters. *Journal of Neuroscience Research* 83: 497-507.

Knüpfer H, Preiss R. 2010. Serum interleukin-6 levels in colorectal cancer patients: a summary of published results. *International Journal of Colorectal Disease* 25:135-140.

Koh MY, Darnay BG, and Powis G (2008) Hypoxia-associated factor, a novel E3-ubiquitin ligase, binds and ubiquitinates hypoxia-inducible factor 1 α , leading to its oxygen-independent degradation. *Molecular Cell Biology* 28:7081–7095.

Komminenia VK, Nagineni CN, William A, Detrick B, Hooks JJ. 2008. IFN- γ acts as anti-angiogenic cytokine in the human cornea by regulating the expression of VEGF-A and sVEGF-R1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 374: 479–484.

Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. 2008. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *The Journal of Clinical Investigation* 118:3367-3377.

Lederle W, Depner S, Schnur S, Obermueller E, Catone N, Just A, Fusenig NE, Mueller MM. 2011. IL-6 promotes malignant growth of skin SCCs by regulating a network of autocrine and paracrine cytokines. *International Journal of Cancer* 128:2803-2914.

Leineweber K, Buscher R, Bruck H, Brodde OE. 2004. Beta adrenoceptor polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology* 369: 1-22.

Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski JA. 2006. The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGR beta) and glucocorticoid resistance. *Basic and Clinical Aspects of Neuroendocrine Immunology in Rheumatic Disease* 1069:1–9.

Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Bergh A, and Ljungberg B. 2006. Hypoxia-inducible factor 1 α expression in renal cell carcinoma analyzed by tissue microarray. *European Urology* 50:1272–1277.

Liu YV, Baek JH, Zhang H, Diez R, Cole RN, Semenza GL. 2007. RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1 α and is required for O₂-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1 α . *Molecular Cell* 25: 207–217.

Luo D, Wang Z, Wu J, Jiang C, Wu J. 2014. The Role of Hypoxia Inducible Factor-1 in Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Research International* 1:1-11.

Luo W, Hu H, Chang R, Zhong J, Knabel M, O'Meally R, Cole RN, Pandey A, and Semenza GL. 2011. Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 145:732–744.

Machein M, Kullmer J, Ronicke V, Machein U, Krieg M, Damer A, Breier G, Risau W, Plate, K. 1999. Differential downregulation of vascular endothelial growth factor by dexamethasone in normoxic and hypoxic rat glioma cells. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 25:104–112.

Malisch JL, Saltzman W, Gomes FR, Rezende EL, Jeske DR, Garand T. 2007. Baseline and stress-induced plasma corticosterone concentrations of mice selectively bred for high voluntary wheel running. *Physiological and Biochemical Zoology* 80:146-156.

Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, and Semenza GL. 2005. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* 105:659–669.

McDonald DM, Choyke PL. 2003. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nature Medicine* 9:713-725.

Melvin A, Rocha S. 2012. Chromatin as an oxygen sensor and active player in the hypoxia response. *Cell Signal* 24:35–43.

Moreno-Smith M, Lutgendorf SK, Sood AK. 2010. Impact of stress on cancer metastasis. *Future Oncology* 6: 1863-1881.

Nájera Valderrábano, Daniela, et al. "Disminución en los niveles de IFN- γ en el plasma de ratones portadores de tumor expuestos a un paradigma de estrés crónico." *Química hoy. Chemistry sciences*. 4.A (2014): 35-36.

Nakao A. 2014 Temporal Regulation of Cytokines by the Circadian Clock. *Journal of Immunology Research*. Volumen 2014, Article ID 614529.

Neurath MF, Finotto S. 2011. Il-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Reviews* 22:83-89.

Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, et al. 2002. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 21: 2000–2008.

Obeida EI, Conzen SD. 2013. The role of adrenergic signaling in breast cancer biology. *Cancer Biomarkers* 13: 161–169.

Park SY, Kang JH, Jeong KJ, Lee J, Han JW, Choi WS, et al. 2011. Norepinephrine induces VEGF expression and angiogenesis by a hypoxia-inducible factor-1 α protein-dependent mechanism. *International Journal of Cancer* 128:2306–2316.

Partanen TA, Arola J, Saaristo A, Jussila L, Ora A, Miettinen M, Stacker SA, Achen MG, and Alitalo K. 2000. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *The FASEB Journal* 14:2087–2096.

Paul A. Volden and Suzanne D. Conzen. 2013. The influence of glucocorticoid signaling on tumor progression. *Brain, Behaviour and Immunity* 30(0): S26–S31.

Payne AS, Cornelius LA. 2002. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. *Journal of Investigative Dermatology* 118(6):915-922.

Peng H, Hamanaka RB, Katsnelson J, Hao LL, Yang W, Chandel NS, and Lavker RM. 2012. MicroRNA-31 targets FIH-1 to positively regulate corneal epithelial glycogen metabolism. *The FASEB Journal* 26:3140–3147.

Pothion S, Bizot JC, Trovero F, Belzung C. 2004. Strain differences in sucrose preference and in the consequences of unpredictable chronic mild stress. *Behavioural Brain Research* 155: 135-146.

Ravi R, Mookerjee B, Bhujwalla ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, and Bedi A. 2000. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes & Development* 14:34–44.

Rohleder N, Aringer M, Boentert M. 2012. Role of interleukin-6 in stress, sleep, and fatigue. *Annals of The New York Academy of Science* 1261: 88-96.

Rose-John S. 2012. IL-6 Trans-Signaling via the soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences* 8:1237-1247.

Rutter M. 2012. Achievements and challenges in the biology of environmental effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109: 17149-17153.

Shan T, Ma J, Ma Q, Guo K, Guo J, Li X, Li W, Liu J, Huang C, Wang F, Wu E. 2013. β 2-AR-HIF-1 α : A Novel Regulatory Axis for Stress-Induced Pancreatic Tumor Growth and Angiogenesis. *Current Molecular Medicine* 13: 1023–1034.

Steptoe A, Hamer M, Chida Y. 2007. The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. *Brain, Behaviour and Immunity* 21:901–912.

Stratatakis C, Chrousos G. 1995. Neuroendocrinology and Pathophysiology of the Stress System. *Annals of the New York Academy of Sciences* 771: 1-18.

Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. 2004. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology* 29: 2007-2017.

Szumiel I. 2005. L5178Y sublines: a look back from 40 years. Part 1: General characteristics. *International Journal of Radiation Biology* 81: 339-352.

Szumiel I. 2005. LR178Y sublines: a look back from 40 years. Part 2: Response to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology* 81: 353-365.

Tanga J, Li Z, Lub L, Cho CH. 2013. B-Adrenergic system, a backstage manipulator regulating tumour progression and drug target in cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* 23:533–542.

Tawara K, Oxford J, Jorcyk CL. 2011. Clinical significance of interleukin (IL)-6 in cancer metastasis to bone: potential of anti-IL-6 therapies. *Journal of Cancer Management and Research* 3: 177-189.

Thaker PH, Lutgendorf SK, Sood AK. 2007. The neuroendocrine impact of chronic stress on cancer. *Cell Cycle* 6: 430-433.

Tonello C, Giordano A, Cozzi V, Cinti S, Stock MJ, Carruba M, Nisoli, E. 1999. Role of sympathetic activity in controlling the expression of vascular endothelial growth factor in brown fat cells of lean and genetically obese rats. *FEBS Letters* 442: 167–172.

Vasilopoulos Y, et al. 2013. High serum levels of HIF-1alpha in psoriatic patients correlate with an over-expression of IL-6. *Cytokine* 62: 38-39.

Vaupel P. 2004. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist* 9:10–17.

Vieira PL, Kalin SP, Wierenga EA, Kapsenberg ML, Jong EC. 1998. Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by in vitro-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *The Journal of Immunology* 161:5245–5251.

Waldner M.J, Foersch S, Neurath MF. 2012. Interleukin-6--a key regulator of colorectal cancer development. *International Journal of Biological Sciences* 8: 1248-1253.

Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. 2009. IL-17 can promote tumor growth through and IL-6-Stat3 signaling pathway. *The Journal of Experimental Medicine* 206: 1457-1464.

Wei D, Le X, Zheng L, et al. 2003. Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene* 22: 319-329.

Xiong A, Yang Z, Shen Y, Zhou J, Shen Q. 2014. Transcription Factor STAT3 as a Novel Molecular Target for Cancer Prevention. *Cancers* 6:926-957.

Yang EV, Kim S, Donovan E, Chen M, Gross AC, Webster JJ, Barsky SH, Glaser R. 2009. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain, Behaviour and Immunity* 23: 267–275.

Yang R, Lin Q, Gao HB, Zhang P. 2014. Stress-related hormone norepinephrine induces interleukin-6 expression in GES-1 cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 47: 101-109.

Yang V, Eubank D. 2013. The impact of adrenergic signaling in skin cancer progression: Possible repurposing of β -blockers for treatment of skin cancer. *Cancer Biomarkers* 13:155–160.

Zamora-Gonzalez E, et al. 2013. A chronic combinatory stress model that activates the HPA axis and avoids habituation in BALB/C mice. *Journal of Neuroscience Methods* 213: 70-75.

Zhang C, Wenger T, Mattern J, Ilea S, Frey C, Gutwein P, Altevogt P, Bodenmueller W, Gassler N, Schnabel PA, Dienemann H, Marme A, Hohenfellner M, Haferkamp A, Pfitzenmaier J, Grone HJ, Kolb A, Buchler P, Buchler MW, Friess H, Rittgen W, Edler L, Debatin KM, Krammer PH, Rutz HP, Herr I. 2007. Clinical and mechanistic aspects of glucocorticoid-induced chemotherapy resistance in the majority of solid tumors. *Cancer Biology & Therapy* 6:278–287.

Zhang H, Lai R. 2014. STAT3 in Cancer—Friend or Foe? *Cancers* 6:1408-1440.

Zheng SS, Chen XH, Yin X, and Zhang BH. 2013. Prognostic significance of HIF-1 α expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *PLoS One* 8:e65753.

Zhou D, Kusnecov AW, Shurin MR, DePaoli M, Rabin BS. 1993. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary adrenal axis. *Endocrinology* 133:2523–2530.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Sonia Montero Molina

Candidato para el Grado de

Maestra en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: EFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE EL LINFOMA MURINO

L5178Y-R

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas

Datos personales: Nacida en Sevilla, España, el 23 de Octubre de 1991, hija de Felipe Montero Alfonso e Ignacia Molina Venegas.

Educación: Egresada de la Universidad de Sevilla, España, grado obtenido en Biología en 2013, siendo primer lugar de generación.